



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Patrones de expresión de genes de adhesión en *Staphylococcus aureus*
aislados de infecciones periodontales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C Alina Uribe García

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
UNIDAD DE HEMATO ONCOLOGÍA E INVESTIGACIÓN HOSPITAL INFANTIL
DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"/ FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.
Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

CD. MX. ENERO, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Patrones de expresión de genes de adhesión en *Staphylococcus aureus*
aislados de infecciones periodontales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C Alina Uribe García

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
UNIDAD DE HEMATO ONCOLOGÍA E INVESTIGACIÓN HOSPITAL INFANTIL
DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"/ FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2020.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/1304/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **04 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **URIBE GARCÍA ALINA** con número de cuenta **94045026** con la tesis titulada **"Patrones de expresión de genes de adhesión en *Staphylococcus aureus* aislados de infecciones periodontales."**, realizada bajo la dirección de la **DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
Vocal: DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
Secretario: DR. VICTOR MANUEL RIVERA AGUILAR
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 02 de diciembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme continuar con mi formación académica y profesional.
- ❖ Al proyecto PAPCA FESI-DIP-PAPCA-2016-26.
- ❖ A mi tutora principal Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por todos los conocimientos transmitidos, por su amabilidad y por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Miembros del Comité Tutor:

- ❖ Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos por compartir sus conocimientos académicos, sus experiencias de vida y por todas las aportaciones realizadas a este trabajo.
- ❖ Al Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar por sus comentarios tan asertivos para la realización de este trabajo, por su paciencia y amabilidad.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- ◆ *En especial a mi tutor Dr. Sergio Vaca Pacheco † por siempre impulsarme a seguir mi formación académica, por ser mi guía para la realización de este trabajo y por todo el conocimiento compartido.*
- ◆ *Al Dr. Eric Monroy Pérez por la confianza que me brindó para la realización de este trabajo, por todas sus valiosas aportaciones realizadas a este trabajo, por siempre explicarme con esa paciencia que lo caracteriza y por su amabilidad.*
- ◆ *A la Bióloga Ma. Patricia Sánchez Yáñez por todo el tiempo invertido en la primera parte de este trabajo, por compartir su conocimiento en el laboratorio y por su amabilidad.*
- ◆ *A la Bióloga Susana Esther González Almazán por toda su experiencia académica compartida desde la licenciatura, por todo el apoyo brindado en el laboratorio y por siempre brindarme una sonrisa.*

- ◆ *A la Dra. Irasema Yolanda Chirino López por siempre recibirme en su laboratorio.*

- ◆ *A la Dra. Ingrid Medina por todo lo que me enseñó y por ser siempre tan amable.*

- ◆ *Al Candidato a Dr. Alejandro Déciga por todo el apoyo brindado en el laboratorio y por compartir sus conocimientos.*

- ◆ *Al Dr. Garzón por permitirnos trabajar en la clínica de Endoperiodontología de la FES-I.*

DEDICATORIA

- ✧ A mis amados padres María Adela García Ibarra y Leonardo Uribe Cabrera por darme la mejor combinación genética y las mejores enseñanzas para llegar hasta donde he querido.*
- ✧ A mis amados hermanos y compañeros de vida Saúl Efrén Ávila García y Edgar Uribe García por impulsarme a seguir adelante y por alegrarme la vida.*
- ✧ A mí amado Paulo Adrián Cruz López por apoyarme siempre y por darle color a mi vida.*
- ✧ A una personita muy especial Itza Natalia Castro Cruz por regalarme siempre un abrazo y una sonrisa.*
- ✧ A Luka por su compañía.*
- ✧ A mis queridos amigos Pamela, Dianita, Iván Goku, Francisco, César, Isabel, Fernando, por tantas risas y buenos momentos.*

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Periodontitis.....	5
1.2 Epidemiología.....	5
1.3 Patógenos causales	8
1.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	8
1.5 <i>Tannerella forsythia</i>	10
1.6 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	12
.....	15
1.7 <i>Treponema denticola</i>	16
1.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.8.1 Adhesinas de <i>S. aureus</i>	21
1.9 Resistencia a los antibióticos de <i>S. aureus</i>	23
1.10 Tipificación de <i>S. aureus</i>	26
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos particulares	30
5. METODOLOGÍA.....	31
5.1 Origen de las muestras.....	31
5.2 Extracción del DNA genómico.....	32
5.3 Identificación de <i>S. aureus</i> por los genes cromosómicos <i>RNAr23S</i> , <i>coa</i> y <i>nuc</i> por la PCR convencional	33
5.4 Identificación de los genes codificados para adhesinas por la PCR convencional ...	34
5.5 Análisis de las muestras amplificadas por la PCR mediante electroforesis	36
5.6 Detección del gen <i>mecA</i> en <i>S. aureus</i>	36
5.7 Susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby Bauer	37
5.8 Secuenciación del gen <i>spa</i> región X por PCR convencional.....	38
5.9 Detección de la biopelícula en las cepas de <i>S. aureus</i> utilizando Agar Rojo Congo (ARC)	39

5.10 Cuantificación de la formación de la biopelícula en las cepas de <i>S. aureus</i> utilizando el método de cristal violeta.....	40
5.11 Infección del cultivo celular A549 con <i>S. aureus</i> : Preparación del inóculo bacteriano e inoculación.....	41
5.12 Cosecha de <i>S. aureus</i> de la superficie del cultivo de la línea celular A549	42
5.13 Extracción del RNA de las cepas de <i>S. aureus</i>	42
5.14 Transcripción reversa o síntesis del cDNA	44
5.15 Expresión de los marcadores de virulencia por la PCR en tiempo real.....	45
6. RESULTADOS	47
6.1 Pacientes con enfermedad periodontal	47
6.2 Grupo control de individuos sin lesión periodontal	49
6.3 Identificación de <i>S. aureus</i> por pruebas bioquímicas y por la PCR	51
6.4 Sexo, edad y diagnóstico de los pacientes con enfermedad periodontal asociada a <i>S. aureus</i>	54
6.5 Sexo, y edad de los individuos sanos (N=10) portadores de <i>S. aureus</i>	56
6.6 Identificación del gen <i>mecA</i> (resistencia a la meticilina) en las cepas de <i>S. aureus</i> ..	57
6.7 Resistencia a los antibióticos en las cepas de <i>S. aureus</i>	57
6.8 Detección de la biopelícula en las cepas de <i>S. aureus</i> utilizando Agar Rojo Congo (ARC)	59
6.9 Detección en placa de poliestireno de la biopelícula en las cepas de <i>S. aureus</i> utilizando Cristal Violeta.....	60
6.10 Detección y expresión de los marcadores de virulencia en las cepas de <i>S. aureus</i> de los pacientes con enfermedad periodontal.....	62
6.11 Patrones de expresión de genes de virulencia asociados al fenotipo de resistencia a antibióticos en las cepas periodontales de <i>S. aureus</i>	65
6.12 Tipificación de la región X del gen <i>spa</i>	67
7. DISCUSIÓN.....	69
7.1 Pacientes estudiados	69
7.2 Identificación de <i>S. aureus</i> en las infecciones periodontales	70
7.3 Cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a la meticilina (MRSA) en los pacientes estudiados...	71
7.4 Detección y expresión de genes de virulencia en las cepas periodontales de <i>S. aureus</i>	75
7.5 Patrones de expresión de genes de virulencia asociados al fenotipo de resistencia a los antibióticos en las cepas periodontales de <i>S. aureus</i>	78
7.6 Tipificación de la región X del gen <i>spa</i> de <i>S. aureus</i>	79
8. CONCLUSIONES.....	81
9. PERSPECTIVAS	83

10. ANEXO 1	84
10.1 Fotografías de los genes amplificados por PCR convencional	84
10.1.1 Adhesinas	84
11. ANEXO 2	90
11.1 Gráficas de PCR en tiempo real y curva de disociación (expresión de los marcadores de virulencia)	90
11.1.1 <i>23S rRNA</i>	90
11.1.2 <i>coa</i>	91
11.1.3 <i>icaAB</i>	92
11.1.4 Adhesinas	93
12. LITERATURA CITADA	105
13. ANEXO 3	124
13.1 Artículo	124

RESUMEN

El tratamiento de las infecciones periodontales asociadas a cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a los antibióticos es un serio problema de salud. La presencia de múltiples genes de virulencia en las cepas de *S. aureus* incrementa la agudeza o cronicidad de las infecciones. El objetivo de este estudio fue caracterizar los patrones de expresión de genes de adhesión en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de infecciones periodontales. *S. aureus* fue identificada por pruebas bioquímicas y por la PCR mediante amplificación de los genes *RNAr23S*, *coa*, *nuc* y *spa* (región X). La resistencia a los antibióticos en las cepas de *S. aureus* se determinó por el método de Kirby-Bauer, el tipo de *spa* se identificó por secuenciación (región X), la cuantificación de la biopelícula se realizó mediante placas de microtítulo de poliestireno, la detección del gen *mecA* (resistencia a meticilina) y los marcadores de virulencia se identificaron por la PCR, y la expresión de los genes implicados en la adhesión celular por la PCR en tiempo real después de la infección en un modelo *in vitro* de células epiteliales humanas (A549). *S. aureus* se identificó en el 18.6% (50/268) de las muestras periodontales. Todas las cepas (n = 50) fueron portadoras del gen de resistencia a la meticilina *mecA*+ (MRSA, n=50) y de los genes de virulencia *spa* (proteína A estafilocócica), *coa* (coagulasa) e *icaAB* (adhesina intercelular); el 96% (n = 48) de *clfB* (factor de aglutinación B) y el 88% (n = 44) de ellos presentaron a los genes *ebps* (proteína de unión a elastina) y *sdrD* (proteína D de serina aspartato). Se observó la resistencia a la ampicilina, dicloxacilina, cefotaxima y penicilina. El

100% de las cepas fue multirresistente de seis a doce de los antibióticos probados. Los tipos de *spa* más frecuentes entre las cepas periodontales de *S. aureus* fueron t91 con el 20% (n=10) y t198 con 18% (n=9). Se identificaron veinticuatro combinaciones distintas de expresión de genes de virulencia asociados al fenotipo de resistencia a los antibióticos. Aunque *S. aureus* ha sido considerado un miembro transitorio de la microbiota oral, nuestros resultados muestran que las cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes (MRSA) aisladas de las enfermedades periodontales son genéticamente distintas ya que expresan múltiples genes de adhesión y son resistentes a una gran cantidad de antibióticos. A pesar de que *S. aureus* no se ha considerado un agente etiológico de periodontitis, estas cepas presentes en los sacos periodontales pueden contribuir con sus genes de virulencia o de resistencia a los antibióticos mediante transferencia genética horizontal. Finalmente este es el primer estudio realizado en México sobre marcadores de virulencia y resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes aislado de enfermedades periodontales.

ABSTRACT

The treatment of periodontal infections associated with antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus* is a serious health problem. The presence of multiple virulence genes in *S. aureus* strains increases the acuteness or chronicity of infections. The objective of this study was to characterize the patterns of expression of adhesion genes in a group of *Staphylococcus aureus* strains of periodontal infections. *S. aureus* was identified by biochemical tests and by PCR by amplification of the *RNAr23S*, *coa*, *nuc* and *spa* genes (region X). Antibiotic resistance in *S. aureus* strains was determined by the Kirby-Bauer method, the type of *spa* was identified by sequencing (region X), the quantification of the biofilm was performed using polystyrene microtiter plates, the detection of the *mecA* gene (methicillin resistance) and virulence markers were identified by PCR, and the expression of genes involved in cell adhesion by real-time PCR after infection in an *in vitro* model of human epithelial cells (A549). *S. aureus* was identified in 18.6% (50/268) of the periodontal samples. All strains (n = 50) were carriers of the *mecA* + methicillin resistance gene (MRSA, n = 50) and of the virulence *spa* genes (staphylococcal protein A), *coa* (coagulase) and *icaAB* (intercellular adhesin); 96% (n = 48) of *clfB* (agglutination factor B) and 88% (n = 44) of them with respect to the genes *ebps* (elastin binding protein) and *sdrD* (serine aspartate D protein). Ampicillin, dicloxacillin, cefotaxime and penicillin resistance are affected. 100% of the strains were multi-resistant from six to twelve of the antibiotics tested. The most frequent types of *spa* among the periodontal strains of *S. aureus* were t91 with 20% (n = 10) and t198 with 18% (n = 9). Twenty-four different combinations of

virulence gene expression associated with the antibiotic resistance phenotype were identified. Although *S. aureus* has been considered a transitional member of the oral microbiota, our results show that *Staphylococcus aureus* Meticillin Resistant (MRSA) strains isolated from periodontal diseases are genetically distinct as they express multiple adhesion genes and are resistant to a large amount of antibiotics. Although *S. aureus* has not been considered an etiologic agent of periodontitis, these strains present in periodontal sacs can contribute to their virulence or antibiotic resistance genes by horizontal genetic transfer. Finally, this is the first study conducted in Mexico on markers of virulence and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* Meticillin Resistant strains isolated from periodontal diseases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por la destrucción de las estructuras que soportan los dientes: el ligamento periodontal, el tejido conectivo y el hueso alveolar; es la principal causa de carencia de los dientes en los adultos (Slots, 2013) (Figura 1). La periodontitis es una infección que se localiza en la estructura mineralizada del diente y pasa a través del integumento, de manera que una parte está expuesta al ambiente externo y otra está arraigada sólidamente en los tejidos conectivos (Figura 2). Este padecimiento es el resultado de la interacción entre agentes patógenos y reacciones inmunes del hospedero pero también está influida por otros factores de riesgo como fumar, consumir alcohol, padecer diabetes mellitus, síndrome metabólico, osteoporosis, obesidad o tener una baja ingesta de calcio y vitamina D (Genko *et al.*, 2013).

1.2 Epidemiología

Las enfermedades bucales son consideradas problemas de salud pública por su alta prevalencia y severidad, que contribuyen en gran medida al agravamiento de las condiciones generales de salud, generando una gran demanda de atención en los servicios de salud del país, con elevados gastos económicos al sistema de salud y al bolsillo de la población. La salud bucal no sólo es importante para la apariencia y el bienestar, sino también para la salud en general del individuo.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO) la periodontitis es la undécima enfermedad más prevalente en el mundo en 2016. En México los enfermos de periodontitis constituyen del 50 al 70% de la población de acuerdo

con las estadísticas de la Secretaría de Salud (SSa) y del sistema de vigilancia epidemiológica de patologías bucales (SIVEPAB), dependiente de la SSa (SSa. Enfermedad periodontal, 2016).

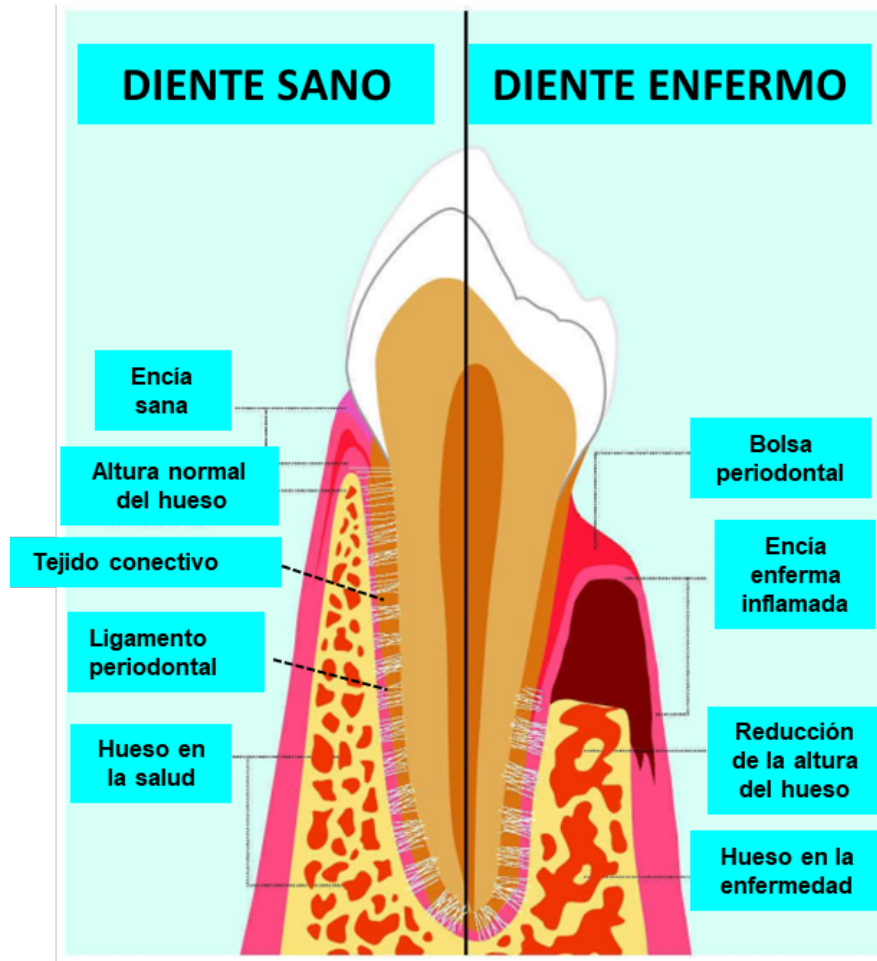


Figura 1. Imagen que muestra las partes de un diente sano y un diente con algunos de los daños provocados por la periodontitis (tomada de Sánchez *et al*, 2010).

PERIODONTITIS

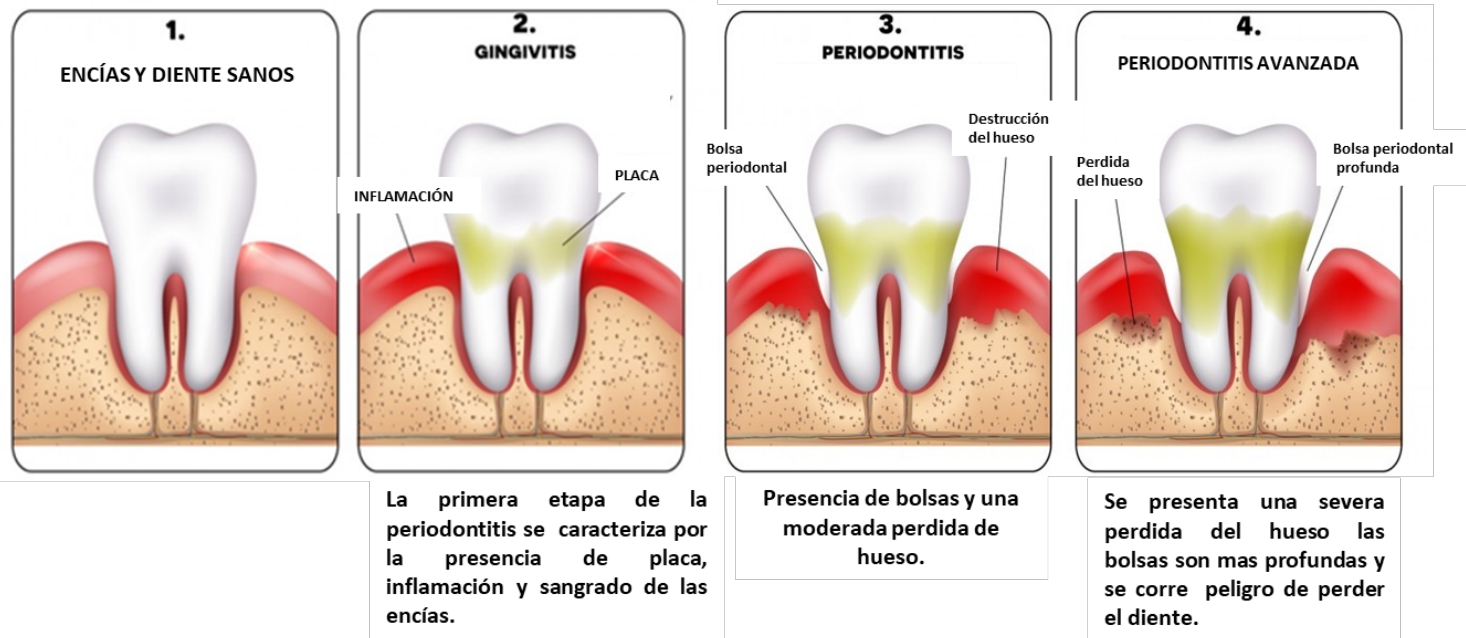


Figura 2. Etapas de la lesión periodontal (tomada de Tefi, SN).

1.3 Patógenos causales

Esta enfermedad es producida por un grupo de bacterias capaces de evadir o de superar el sistema inmune del paciente. Entre las principales bacterias que la ocasionan se encuentran las siguientes: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Treponema denticola*. Estas bacterias tienen la capacidad para penetrar a las células del hospedero; han sido detectadas en el interior de células orales epiteliales humanas tanto de personas sanas como con periodontitis, aunque en números significativamente mayores en estas últimas (Colombo *et al.*, 2007). Adicionalmente, algunas otras bacterias conviven e interactúan con las anteriores y su papel comienza a definirse apenas, como *Streptococcus gordonii* y *Staphylococcus aureus* (Colombo *et al.*, 2013 y Kuboniwa *et al.*, 2017).

1.4 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis es un cocobacilo Gram negativo, anaerobio, no móvil (Figura 3). Pertenece al phylum Bacteroidetes, habita en la cavidad oral y causa periodontitis. Una evidencia clara de que produce periodontitis fue la demostración de que cuando se implantó *P. gingivalis* en monos, cuya microbiota se había suprimido por tratamiento con rifampicina sistémica, se inició el desarrollo de la enfermedad periodontal (Holt *et al.*, 1988). Nelson *et al.*, en el 2003 secuenciaron el genoma de 2,343,479 pb de la cepa virulenta W83 y encontraron que puede metabolizar once aminoácidos para obtener energía, quizá productos de la degradación de proteínas del hospedero por proteasas bacterianas, y generar productos metabólicos finales tóxicos para el tejido gingival humano (butirato, propionato y

amonio) que contribuyen al desarrollo de la enfermedad periodontal (Takahashi *et al.*, 2000). Entre sus principales factores de virulencia se encuentran las gingipaínas [Arg-gingipaína (Rgp) y Lis-gingipaína (Kgp)]; es decir, proteasas que hidrolizan proteínas de residuos arginina y lisina.

Otro importante factor de virulencia es la cápsula, cuya composición de carbohidratos es variable entre las cepas, pero suele contener aminoazúcares como galactosamina y glucosamina. La cápsula protege a la bacteria contra la fagocitosis y le confiere resistencia al efecto bactericida del suero (Holt *et al.* 1999).

Se ha reportado también la producción de dos hemolisinas por *P. gingivalis*; estas proteínas son capaces de lisis a los glóbulos rojos y su papel es aportar hierro a la bacteria. La hemoglobina y el hemo se liberan por la hemólisis de los hematocitos y son reconocidos por receptores de la superficie bacteriana y luego transportados al periplasma, una vez en el interior de la bacteria el hierro se libera del hemo (Runyen-Janecky 2013). Ambas hemolisinas se localizan principalmente en las vesículas de membrana externa (OMVs; outer membrane vesicles) liberadas por la bacteria (Karunakaran *et al.*, 1993 y Deshpande *et al.*, 1999). Estas OMVs contienen además, gingipaínas, lipopolisacárido (LPS), cápsula y fimbrias (Amano *et al.*, 2010a).

P. gingivalis puede ingresar a las células epiteliales y endoteliales, lo que le permite escapar del sistema inmune del hospedero y protegerse de la acción de los antibióticos durante aproximadamente 48 h, aunque algunas bacterias salen de las células inicialmente infectadas y son capaces de infectar a otras, lo que prolonga su período de infección (Amano *et al.*, 2010b).

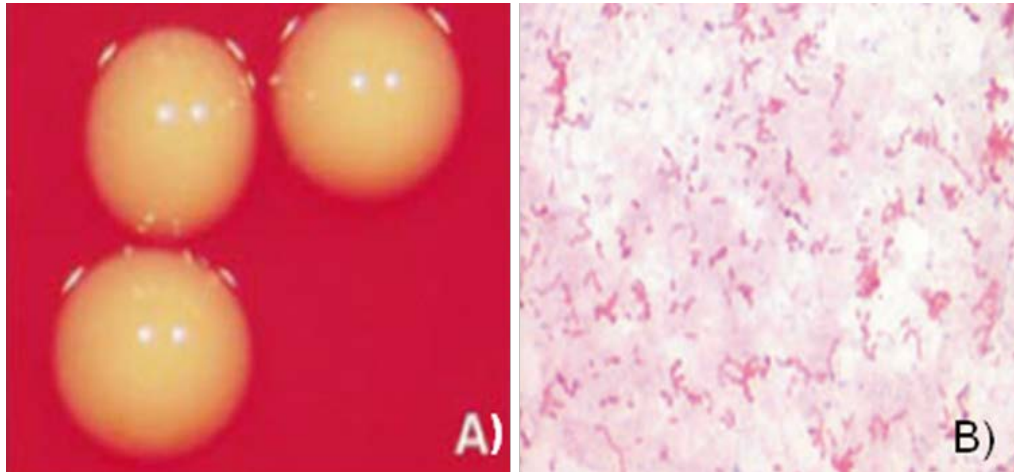


Figura 3. A) Morfología colonial observadas con microscopio estereoscópico a 4,5 (Mayorga-Fayad et al., 2007) y B) tinción Gram de *Porphyromonas gingivalis* (Lamont y Jenkinson, 2010).

1.5 *Tannerella forsythia*

Es una bacteria anaerobia Gram negativa, de morfología fusiforme, perteneciente al phylum Bacteroidetes (Figura 4), que habita en la cavidad oral de los humanos (Tanner *et al.*, 1986 y Sakamoto *et al.* 2002) y que causa periodontitis. Esta bacteria ha sido poco estudiada debido a la naturaleza fastidiosa de su crecimiento, requiere hemina, menadiona, L-cisteína y ácido N-acetil murámico para crecer.

Varios factores de virulencia de *T. forsythia* se han identificado, entre ellos la capa superficial S (S-layer), la proteína BspA, glicosidasas y dos proteasas (Sharma 2010 y Tanner *et al.*, 2006). La capa superficial (S-layer) de *T. forsythia* es su componente más externo y está formada por glicoproteínas, entre las que se encuentran dos de alta masa molecular, de 220 y 210 kDa: TfsA y TfsB (Lee *et al.*, 2016). Estudios *in vitro* con mutantes carentes de la capa S muestran que esta retarda la capacidad de los macrófagos y de los monocitos humanos para montar una respuesta con citocinas (Sekot *et al.*, 2011). La capa S constituye un escudo protector para la bacteria y actúa como atrapadora de iones y como tamiz

molecular para metabolitos en el ambiente, también colabora en la adhesión de la bacteria (Sabet *et al.*, 2003).

Se ha identificado una proteína asociada a la superficie BspA (*Bacteroides* surface protein A) esta es secretada y tiene secuencias de repetidos ricos en leucina (LRR; leucine-rich repeats). Esta proteína contiene dos regiones D1 y D2 (formadas por LRR) en el extremo amino terminal con 14 y 6 repeticiones en tándem de 23 aminoácidos del LRR cada una. El extremo carboxilo terminal contiene 4 motivos inmunoglobulin-like llamados Big_2. La presencia de los dominios LRR sugiere que esta proteína podría participar en interacciones proteína-proteína con factores o componentes de otras bacterias en el biofilm y se ha demostrado que se une a la fibronectina y al fibrinógeno extracelulares (Sharma *et al.*, 1998).

En la superficie de *T. forsythia* se ha identificado una serín-proteasa de 81 kDa cuyo papel podría ser degradar péptidos pequeños derivados de la hidrólisis de proteínas grandes realizada por otras bacterias orales (Grenier 1995). Posteriormente se identificó otra cisteín-proteasa de 47.8 kDa, denominada PrtH, con la capacidad de degradar proteínas más grandes; esta proteasa puede estar implicada en la desintegración del epitelio gingival y en inducir la producción de interleucina-8 por las células separadas. Ambas actividades podrían participar en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Hamlet *et al.*, 2008).

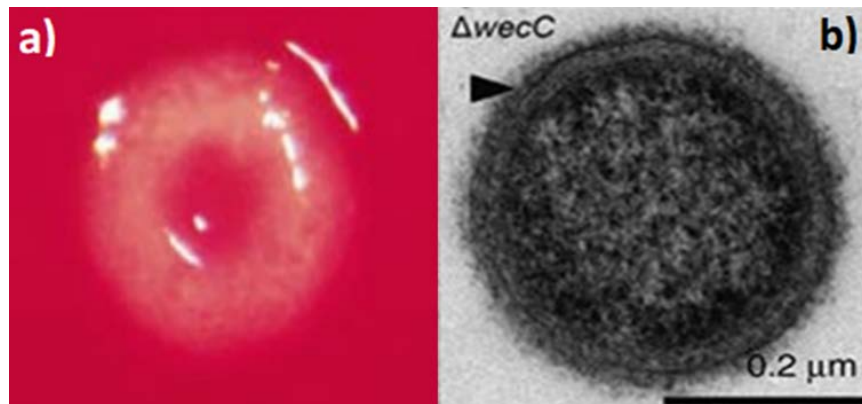


Figura 4. a) Morfología colonial observadas con microscopio estereoscópico a 4.5 (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007) y b) Microscopia electrónica de trasmisión de cepas de *Tannerella forsythia* (Settem *et al.*, 2012).

1.6 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans* perteneciente al phylum Proteobacteria, es un bacilo Gram negativo facultativo (Figura 5), cuyo hábitat natural es la cavidad oral, que produce periodontitis, aunque también se encuentra entre la microbiota oral de las personas con periodonto sano (Haffajee *et al.*, 1994; Fine *et al.*, 2007). Se han descrito seis serotipos de esta bacteria (a-f), de los cuales el b es más común en la periodontitis agresiva (Yang *et al.*, 2004).

Uno de los principales factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* es la leucotoxina LtxA, la cual pertenece a la familia de las citolisinas de la familia de las RTX (repeats-in toxin). Esta leucotoxina, de aproximadamente 113 kDa, se ha encontrado en microvesículas liberadas por la bacteria (Kato *et al.*, 2002), sin embargo, su vía fundamental de transporte a la membrana externa de la bacteria es el sistema de secreción tipo I (TISS, por sus siglas en inglés); se ha

demostrado que el suero humano provoca la liberación de LtxA de la superficie de *A. actinomytencomitans* (Johansson *et al.*, 2003). LtxA lisa a los monocitos/macrófagos, lo que le permite a la bacteria evadir las defensas locales del paciente.

Otro de los factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* es la CDT (cytolethal distending toxin) que participa en la conservación de la infección mediante la modulación de la respuesta inmune. Es una toxina tripartita, contiene tres subunidades: cdtB es la subunidad tóxica activa, mientras que cdtA y cdtC son las subunidades de unión a las células blanco; cdtC permite la liberación de la subunidad cdtB a las células (Smith *et al.*, 2006). La subunidad cdtB tiene actividad de DNAasa I y, una vez en el núcleo, daña al DNA y bloquea el ciclo celular de las células blanco en la fase G2 impidiéndoles la progresión a mitosis, lo que les provoca apoptosis (Henderson *et al.*, 1998 y Li *et al.*, 2011).

Un factor más de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* es el lipopolisacárido (LPS) que induce mediadores proinflamatorios, tales como IL-1 β , -6,-8 y TNF. El LPS puede diseminarse por vía hematogena en las embarazadas e inducir apoptosis en los trofoblastos de la placenta (Li *et al.*, 2011); este efecto está relacionado con el bajo peso de los bebés prematuros de madres que padecen periodontitis (Offenbacher *et al.*, 1996 y Sánchez *et al.*, 2004).

A. actinomycetemcomitans forma biofilm mediado por quórum sensing via el autoinductor 2 (AI-2). Las funciones de AI-2 incluyen regular la expresión de factores de virulencia, captación de hierro, formación de biofilm y también el crecimiento planctónico de la bacteria en condiciones limitantes de hierro (Novak *et al.*, 2010).

Adicionalmente, la proteína GroEL de *A. actinomycetemcomitans* purificada promueve la proliferación de células epiteliales de los ligamentos periodontales a concentraciones de 0.4-1 mg/mL. La proliferación apical aumentada en el epitelio de unión incrementa la profundización de las cavidades periodontales y por ello el área disponible para el crecimiento de la bacteria. Mayores concentraciones de GroEL (10 mg/mL) tienen efectos citotóxicos sobre las células epiteliales, de modo que según la abundancia de *A. actinomycetemcomitans* en distintos sitios de la cavidad oral, tanto la muerte celular como la proliferación bacteriana pueden ser consecuencia de GroEL (Goulhen *et al.*, 1998 y Goulhen *et al.*, 2003).

El distinto grado de patogenicidad de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* presentes en la enfermedad periodontal y en sujetos sanos puede deberse a variaciones genéticas entre ellas, de modo que todas tengan un genoma "core" (genes compartidos por todas las cepas) y un grupo de genes accesorio (genes compartidos por algunas, pero no por todas las cepas) (Hacker *et al.*, 2001). Entre los genes accesorios, aquellos organizados como islas genómicas podrían codificar nuevos determinantes de virulencia adquiridos por *A. actinomycetemcomitans* mediante transferencia genética horizontal. Por secuenciación del genoma completo de 14 cepas de *A. actinomycetemcomitans* geográfica y clínicamente diversas se encontró que el pangenoma de *A. actinomycetemcomitans* está compuesto por 3,220 genes que codifican para proteínas, los cuales incluyen 1550 genes core y 1,670 genes accesorios y se identificaron 387 islas genómicas (23% de los genes accesorios) en los genomas de las 14 cepas (Kittichotirat *et al.*, 2016).

De manera que, como puede advertirse, la investigación sobre *A. actinomycetemcomitans* es un campo de estudio muy activo.

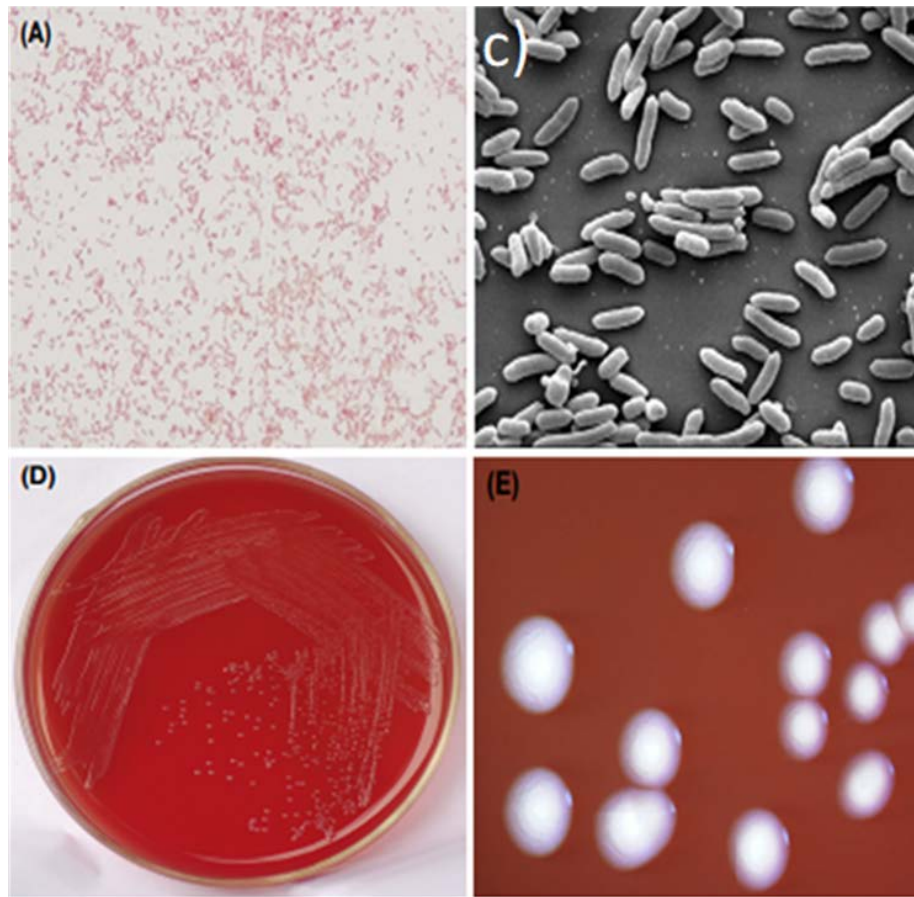


Figura 5. A) Tinción de Gram, C) Imagen de microscopia electrónica de barrido, D) Morfología colonial en agar sangre BHI, E) Colonias observadas en estereomicroscopio de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Li y Zhou, 2015).

1.7 *Treponema denticola*

Treponema denticola es una bacteria pertenece al phylum Spirochaetes (junto con *T. pallidum*, causante de la sífilis, entre otras) y que actualmente se considera, como todas las espiroquetas, ni Gram negativa ni Gram positiva, sino como un cluster distinto de ambas (Figura 6). Presenta variaciones a nivel de la membrana externa de su pared, no presentan lipopolisacáridos (LPS), carece de ácido-desoxi-mano-octulosónico, heptosas y ácido grasos; tiene una disposición flagelar 2-4-2, presenta un movimiento espasmódico bastante rápido. Este microorganismo se ha aislado con frecuencia de pacientes con periodontitis y se le encuentra asociado con *P. gingivalis* y *T. forsythia* (Kasuga *et al.*, 2000 y Takeuchi *et al.*, 2001); esta asociación es la que ha llevado a considerar a la periodontitis como una enfermedad polimicrobiana que es resultado del sobrecrecimiento de unas cuantas especies que forman parte de la microbiota oral normal (Holt *et al.*, 2005). Así, se ha reportado que la composición de la placa subgingival en pacientes con periodontitis contenía las bacterias del llamado "red complex": *T. denticola*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* (50%) y a baja frecuencia *P. gingivalis* y *T. forsythia* (1-2%); es probable que *T. forsythia* colonice la placa subgingival antes que *P. gingivalis* y *T. denticola* (Byrne *et al.*, 2009).

T. denticola forma parte de un biofilm formado por muchas especies, llamada placa subgingival y habita los surcos periodontales profundos, que están protegidos de las fuerzas del flujo de la saliva y de la masticación (Kolenbrander *et al.*, 2002). Se ha reportado que se localiza en la superficie de los biofilms bacterianos subgingivales, en la interfase entre éstos y el epitelio gingival (Zijng *et*

al., 2010). Durante el crecimiento de *T. denticola* como biofilm se ha identificado un bacteriófago lisogénico funcional ϕ td1 que se ha sugerido podría movilizar genes de virulencia por transducción (Mitchell *et al.*, 2010).

La movilidad y la quimiotaxis le permiten a *T. denticola* responder a estímulos ambientales detectados por proteínas de quimiotaxis aceptoras de metilos (MCPs, por methyl chemotaxis proteins) que atraviesan la membrana interna. Estas señales son transducidas vía las proteínas de quimiotaxis citosólicas CheA, Chew y CheY, que modulan la dirección de la rotación del motor flagelar. La adaptación se consigue por la metilación/desmetilación de las MCPs por las proteínas CheR y CheB (Sim *et al.*, 2005). La movilidad y la quimiotaxis le permitirían a esta bacteria colonizar rápidamente nuevos sitios, por lo que constituyen uno de sus principales factores de virulencia.

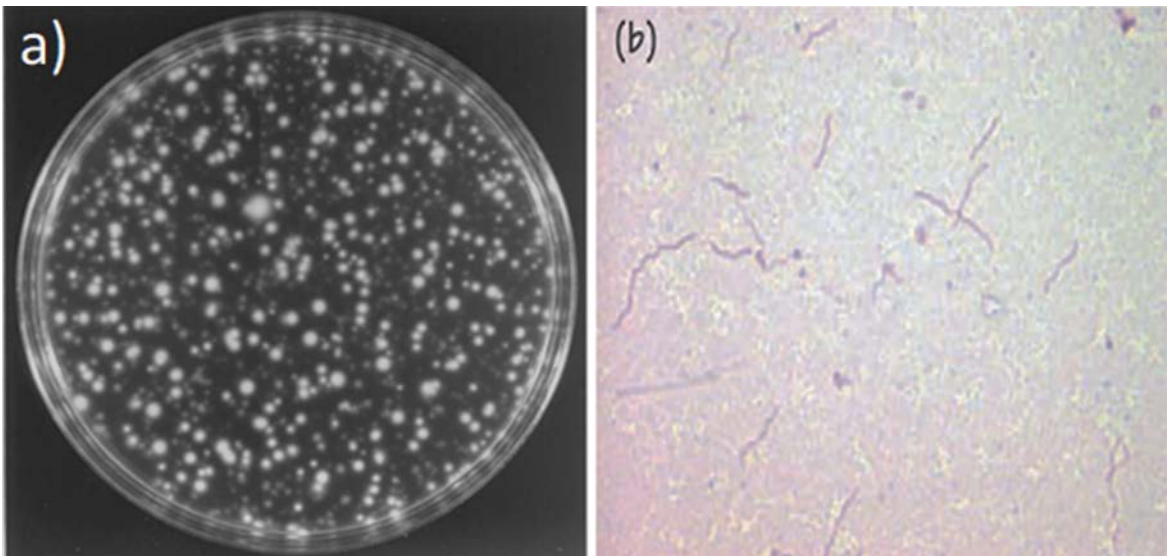


Figura 6. a) Colonias en placas de agarosa al 0.8% (Chi *et. al.*, 2002) y b) tinción de Gram de *Treponema denticola* (Lamont y Jenkinson, 2010).

1.8 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva en forma de coco que se agrupa en racimos (Figura 7). Es un patógeno oportunista habitante de la microbiota de aproximadamente 30% de las personas (Wertheim *et al.*, 2005) y es capaz de causar enfermedades desde leves hasta graves como neumonía o endocarditis (Tong *et al.*, 2015). Los reportes de frecuencias de aislamiento de *S. aureus* de la cavidad oral varían entre 24% y 84% (Jackson *et al.*, 1999 y Ohara-Nemoto *et al.*, 2008). Se ha sugerido que *S. aureus* puede tener un papel en la falla de implantes dentales (Kronstroöm *et al.*, 2001, Rokadiya *et al.*, 2008 y Siddiqi *et al.*, 2014).

Distintos factores genéticos tanto de la bacteria como del hospedero influyen sobre el desarrollo de las infecciones (Messina *et al.*, 2016). Entre los factores genéticos de la bacteria destacan los genes de virulencia, como los que codifican para adhesinas (Josee *et al.*, 2017) y toxinas (Otto 2014) y los que confieren resistencia a antibióticos (Hiramatsu *et al.*, 2014). Adicionalmente, *S. aureus* puede adquirir genes por transferencia genética horizontal (conjugación, transducción, transformación) (Lindsay 2014 y Juhas 2015) la que puede verse favorecida por el crecimiento bacteriano como biofilm (Savage *et al.*, 2013) y esto contribuye ampliamente a la diversidad de los genotipos de las cepas. Entre los factores genéticos del hospedero se ha documentado, sin que se conozcan las razones, que algunos grupos étnicos genéticamente distintos (afroamericanos, maorís de Nueva Zelanda, aborígenes australianos y aborígenes canadienses), así como los pacientes de algunas enfermedades genéticas raras (p. ej. síndrome

de hiper-IgE) son más susceptibles a la infección por *S. aureus* (Messina *et al.*, 2016).

La placa bacteriana está formada por bacterias que se adhieren a los dientes formando una biopelícula que contiene muchas especies, entre las que se encuentran cepas multirresistentes a antibióticos de *S. aureus* (Kim *et al.*, 2015). Esta bacteria produce varios factores de virulencia entre ellos las adhesinas de la familia MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva. Estas adhesinas están codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB* (fibronectin-binding protein A and B), *spa* (Staphylococcal protein A), *clfA* y *clfB* (clumping factor A and B), *cna* (collagen adhesion), *bbp* (sialoprotein-binding protein), *ebpS* (elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus*), *map/eap* (extra-cellular adhesion protein) y *sdrC*, *sdrD* and *sdrE* (serine aspartate repeat proteins C, D, y E) (Foster *et al.*, 1998). Otros de sus factores de virulencia son las toxinas y el operón *icaADBC* que codifica para componentes del biofilm (Götz 2002). Entre las toxinas se encuentran las citotoxinas que provocan daños a las membranas de las células infectadas, en este grupo se encuentran las hemolisinas (alfa, beta, delta y gama) y la leucocidina de Pantón-Valentine; las primeras causan poros sobre las plaquetas, los monocitos y los glóbulos rojos, también provocan destrucción tisular y abscesos; las segundas lisan a los neutrófilos polimorfonucleares y monocitos (Omuse *et al.*, 2013). Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D y F) estas se asocian a intoxicación alimentaria y las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) responsables del

síndrome de la piel escaldada (Koosha *et al.*, 2014). La formación de biopelícula por *S. aureus* cursa por dos etapas; la primera es la colonización, en la que se adhieren las bacterias a la superficie y la segunda es la multiplicación bacteriana, que conduce a la formación de varias capas de éstas. La formación de la biopelícula de *S. aureus* depende del operón *ica*, formado por los genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *ica C* y por el gen *icaR*, que codifica al represor. La expresión del operón *ica* codifica para las enzimas que forman el polisacárido intercelular adhesivo, un polímero de N-acetilglucosamina (Götz 2002), que les permite a las bacterias adherirse a una superficie y unirse entre sí.

Para formar biopelícula por expresión del operón *ica*, es necesaria la represión de *agr* (accessory gene regulator). *agr* codifica para un sistema de quórum sensing que se activa en la transición del crecimiento exponencial a la fase estacionaria, provocando que las células se desprendan del biofilm (Boles *et al.*, 2008), lo que facilita la colonización de nuevos sitios. La molécula que activa el locus *agr* es el péptido autoinductor de ocho aminoácidos (Novick *et al.*, 2008). El quórum sensing ocurre cuando las células de *S. aureus* en crecimiento producen AIP y lo secretan; cuando éste alcanza la concentración umbral (quórum sensing) se une al receptor AgrC e induce su fosforilación, el fosfato se transfiere a AgrA, el cual activa la transcripción a partir de los dos promotores de *agr*, lo que inicia una cascada regulatoria que va en contra de la expresión de una gran cantidad de factores de virulencia: como la reducción de la síntesis de las adhesinas MSCRAMMs (componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva) y aumento de la producción de exotoxinas (Novick 2003).

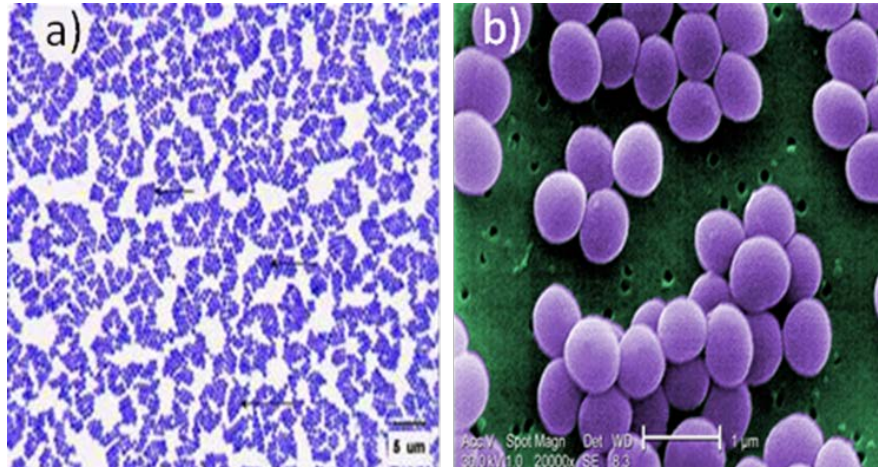


Figura 7. a) Tinción de Gram (Taylor y Unakal, 2019) y b) microscopía electrónica de barrido de *Staphylococcus aureus* (Arduino y Haney, 2000).

1.8.1 Adhesinas de *S. aureus*

Se han descrito dos proteínas de unión a fibronectina: FnBPA y FnBPB (fibronectin binding protein A y B). Éstas presentan un dominio amino terminal formado por los dominios N1, N2, y N3 que les permite unirse a la elastina y al extremo carboxilo terminal de la cadena y del fibrinógeno; sin embargo, la FnBPA a diferencia de la B es indispensable para la internalización de las bacterias a la célula huésped y tiene una región con 11 repeticiones de aminoácidos secuencia que le permite la unión con la fibronectina adyacente al dominio amino terminal. FnBPB tiene una región con 10 repeticiones de aminoácidos que también le permiten unirse a la fibronectina (Pilka *et al.*, 2006 y Piroth *et al.*, 2008).

La proteína Spa (staphylococcal protein A), otra de las adhesinas de *S. aureus*, se encuentra anclada a la pared celular por puentes cruza dos de pentaglicina y se distribuye a lo largo de la superficie bacteriana. Tiene la capacidad de unirse a la inmunoglobulina IgG inactivando su actividad opsonizante. Todas las cepas de *S. aureus* la poseen, está formada por cinco módulos homólogos (EABCD) en el

extremo amino terminal que forman 3 hélices α , que permiten la unión de la proteína a la región Fc de IgG. Cada módulo está formado por paquetes triples helicoidales separados individualmente que le permiten unirse a ligandos distintos. En esta misma región, en la superficie celular, se localiza la región Xr, formada por repeticiones de octapéptidos secuencias variables en número, y seguida ésta por una región constante Xc (Foster *et al.*, 2014).

Una adhesina más del *S. aureus*, es la proteína de unión a colágeno, Cna (collagen adhesin); que tiene una secuencia señal seguida por un dominio A de 55 KDa dividida en los subdominios N1, N2 y N3. Los subdominios N1 y N2 contienen pliegues similares a IgG; también incluye un motivo LPXTG (Leu-Pro-any-Thr-Gly) y una cola citoplásmica rica en aminoácidos con carga positiva; el dominio A se une a la pared celular mediante repeticiones del dominio B, las cuales pueden variar de 1 a 4 en distintas cepas (Madani *et al.*, 2017). La presencia de la adhesina Cna es suficiente y necesaria para que *S. aureus* se adhiera al cartílago *in vitro*, además le permite unirse a la proteína del complemento C1q y a la proteína laminina mediante los subdominios N1 y N2 (Valotteau *et al.*, 2017).

S. aureus tiene dos proteínas de unión a fibrinógeno, denominadas factor de agregación o clumping factor A y B: ClfA y ClfB. Éstas presentan en su estructura una secuencia señal secretora amino terminal, un motivo LPXTG (Leu-Pro-any-Thr-Gly) en el carboxilo terminal, esencial para la correcta localización de la proteína en la pared celular, un dominio hidrofóbico que abarca la pared y la membrana y una cola con carga positiva. Se caracterizan por la presencia de una región, conocida como región R, que consiste en una repetición de dipéptidos de serina y ácido aspártico (repeticiones SD). La región R conecta el dominio de

extensión de la pared celular a la región de unión a ligando única o región A; esta última se ubica en el extremo del N-terminal y se subdivide en los dominios N1, N2 y N3. Donde también N2 y N3 forman pliegues similares a inmunoglobulina G que unen ligandos mediante el mecanismo DLL (anclaje-llave cerradura). Cabe mencionar que ClfA y ClfB pertenecen a una familia de proteínas más grande, las llamadas proteínas de repetición de serina-aspartato, Sdr, entre las que destacan SdrC, SdrD y SdrE, que también funcionan como adhesinas en *S. aureus* (Foster *et al.*, 2014).

Una adhesina más de la familia MSCRAMMs es la proteína Bbp (sialoprotein binding protein), que se localiza en la superficie bacteriana y permite la adhesión al fibrinógeno de la matriz extracelular de las células humanas, por lo que es un factor de virulencia importante (Zhang *et al.*, 2015).

Otra adhesina es la proteína EbpS (elastin binding protein of *Staphylococcus aureus*), una proteína integral de la membrana de *S. aureus*, que media la unión a la elastina, un componente abundante en los tejidos del hospedero que requieren elasticidad como la piel, los pulmones y los vasos sanguíneos mayores. El sitio de unión de Ebps en la elastina celular es accesible a la adhesina y esta interacción puede promover la colonización bacteriana y facilitar la patogénesis (Downer *et al.*, 2002).

1.9 Resistencia a los antibióticos de *S. aureus*

La frecuencia de *S. aureus* en infecciones periodontales ha sido estudiada recientemente, sin embargo, la detección y expresión de genes de virulencia *in vivo* o en modelos *in vitro*, asociados a la multiresistencia a los antibióticos en

cepas periodontales de *S. aureus* ha sido poco estudiada. En las bacterias la resistencia a los antibióticos puede ser una característica que poseen de manera natural o adquirida (cuando las bacterias sensibles obtienen genes que codifican un mecanismo de resistencia). En el caso de la resistencia adquirida los genes se transportan por plásmidos y transposones mediante los mecanismos de conjugación, transducción y transformación. Los mecanismos fundamentales de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su acción, son la inactivación del antibiótico por enzimas (la bacteria produce enzimas que inactivan el antibiótico, como ejemplo se encuentran las β -lactamasas), modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana (por ejemplo, puede ser que modifiquen su pared para impedir la entrada a ciertos antibióticos o que provoquen la salida del mismo para evitar su acumulación) y la alteración por parte de la bacteria de su punto blanco (impide o dificulta la acción del antibiótico). Cabe mencionar que una bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o más antibióticos y éstos a su vez pueden ser inactivados por distintas vías de defensa bacteriana (Tabla 1) (MacGowan & Macnaughton, 2017; Haaber, Penadés & Ingmer, 2017).

S. aureus tiene la capacidad de expresar una gran variedad de genes que codifican para factores de virulencia y/o resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, estos genes se pueden encontrar en los *MGEs* (mobile genetic elements) como son las secuencias de inserción, fagos, plásmidos, transposones, islas de patogenicidad y el *Staphylococcal Cassette Chromosome* (SCC) (Malachowa y DeLeo, 2010); en este último, se incluye al SCCmec, que tiene los genes *mec*, que codifican a las proteínas que confieren la resistencia a la

metecilina y a muchos antibióticos β -lactámicos (Ito et al., 2003) . La metecilina es un antibiótico semisintético que se obtiene por desaminación de la penicilina. Este fenotipo de resistencia a metecilina se le denomina *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) y causa un gran problema para tratar infecciones causadas por *S. aureus*. En la actualidad se conocen dos tipos de cepas MRSA asociadas a humanos, el MRSA asociado a los hospitales (HA-MRSA, del inglés Hospital-Associated MRSA), que es el fenotipo más común y el MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA, del inglés Community-Associated MRSA) (Lindsay, 2010).

Tabla 1. Principales antibióticos a los que ha presentado resistencia cepas de *S. aureus* (modificado de Bustos-Martínez et al., 2006).

Antibióticos	Mecanismo de acción	Resistencia bacteriana
Penicilinas β -lactámicos Glucopéptidos	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Hidrólisis enzimática del Anillo β -lactámico Mutación de las PBPs Síntesis de un di péptido que reduce la afinidad de la vancomicina
Aminoglucósidos Macrólidos Tetraciclinas	Inhibición de la síntesis de proteínas	Mutación del sitio de unión en el ribosoma sub U 30S Metilación del <i>rRNA</i> 23S Bomba de expulsión Modificación por acetilación Bombas de expulsión Mutación ribosomal de la Sub U 30S

<p>Quinolonas</p> <p>Inhibidores de síntesis de Folato</p>	<p>Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos</p>	<p>Mutación en la subunidad A de la girasa y topoisomerasa IV</p> <p>Afinidad reducida de la DHFR (dihidrofolato reductasa)</p> <p>Sobreproducción de PABA ácido <i>p</i>-aminobenzoico</p>
--	--	---

1.10 Tipificación de *S. aureus*

Actualmente existen varios métodos moleculares para tipificar cepas de *S. aureus*, siendo la secuenciación de la región Xr hipervariable de la proteína A del gen *spa* el que proporciona un esquema de tipificación de secuencia de un solo locus, este se caracteriza por ser un método rápido, reproducible y de bajo costo, además de contar con una nomenclatura bien establecida y con bases de datos públicos depositados en Internet Ridom SpaServer (spa.ridom.de) (Paniagua-Contreras et al., 2014b). Esta base de datos contiene los tipos de *spa* conocidos hasta ahora (17,883), sus frecuencias, y los países de origen de cada uno.

2. ANTECEDENTES

- En 2015 Kim y Lee realizaron un estudio para obtener patrones de resistencia a antibióticos y genes de virulencia en muestras de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes con periodontitis. Obtuvieron saliva de 112 pacientes con periodontitis, en Seúl y Cheonan. Sus resultados mostraron que *S. aureus* fue aislado de 41 (36.6%) muestras de saliva, de las cuales el 88% fue resistente tanto a la ampicilina como a la penicilina y el 2% a la oxacilina. Se detectaron enterotoxinas en el 83% (n=34) de las cepas de *S. aureus*. El gen de hemolisina celular *hld* se detectó en el 100% (n=41) de las cepas y el de *hla* en el 98% (n=40). Todas las cepas resistentes y a la penicilina y la ampicilina fueron portadoras del gen *blaZ*. El gen *aph (3') IIIa*, que codifica una enzima modificadora de aminoglucósidos, se detectó en el 46% (n=19) de las cepas. Estos autores concluyeron que es necesario estudiar los patrones de resistencia a los antibióticos en las cepas de *S. aureus*, y la infección cruzada en los pacientes de las especialidades periodontológicas.
- Koukos y colaboradores en 2015 evaluaron la prevalencia de *Staphylococcus aureus* y cepas MRSA en muestras de placa y lengua de sujetos sistémicamente sanos con salud periodontal, otros con gingivitis o con periodontitis crónica. La prevalencia de *S. aureus* y MRSA se examinó por la PCR punto final. Los resultados mostraron que *S. aureus* se detectó en el 18% de todos los participantes (sanos, gingivitis y periodontitis). Estos investigadores concluyen que *S. aureus* debe considerarse un miembro de la microbiota transitoria y que la cavidad oral es un hábitat inusual de cepas MRSA.
- Colombo y colaboradores en el 2016 investigaron sobre la diversidad ecológica del microambiente periodontal que puede proporcionar condiciones adecuadas

para la colonización de especies que generalmente no se consideran miembros de la microbiota oral. En este trabajo determinaron la prevalencia y los niveles de especies patógenas de relevancia médica en la microbiota de individuos con distintos estados clínicos de la enfermedad periodontal. Para la investigación obtuvieron la biopelícula subgingival de pacientes con salud periodontal (SP, n = 81), gingivitis (G, n = 55), periodontitis agresiva generalizada (PAG, n = 36) o periodontitis crónica (PC, n= 98), y se analizaron 39 taxones microbianos usando la técnica de hibridación DNA-DNA. Algunas de las especies encontradas fueron *Saphenum*, *Clostridium difficile* y *Olsenella uli* en alta prevalencia en la microbiota subgingival de la población de estudio. Las especies que se relacionaron con la inflamación periodontal y la destrucción del tejido fueron *Enterobacterias*, *C. albicans*, *Neisseria spp.*, *P. aeruginosa*, *O. uli*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens* y *Filifactor alocis*. Mientras que las especies de *Fusobacterium necrophorum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* se asociaron con la salud periodontal. Los investigadores concluyen que las especies patógenas de importancia médica pueden detectarse en una alta prevalencia en la microbiota periodontal y que Independientemente del papel en la salud o enfermedad periodontal, la biopelícula periodontal puede ser una fuente de diseminación y desarrollo de infecciones sistémicas por estos microorganismos patógenos.

- Passariello y colaboradores en el 2017 investigaron algunos patrones microbianos asociados a la coinfección por diferentes virus del herpes y con la progresión de la periodontitis agresiva generalizada (PAG). En este trabajo obtuvieron 165 muestras microbiológicas de sujetos afectados por PAG y fueron analizadas para 40 especies bacterianas por la técnica de hibridación ADN-ADN y para el herpes simplex 1 (HSV-1), citomegalovirus humano (CMV) y virus de la

barra de Epstein (EBV) por la PCR. Los análisis que realizaron evidenciaron varias asociaciones de virus / bacterias: a) EBV con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; b) CMV con *A. actinomycetemcomitans*, *Veillonella parvula*, *Parvimonas micra* y *Fusobacterium nucleatum* subsp.; c) HSV-1 con *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium periodonticum* y *Staphylococcus aureus*. Los investigadores sugieren con los datos microbiológicos que los virus del herpes probablemente no sean simples espectadores de progresión de la enfermedad y que los patrones específicos de la placa subgingival se correlacionan con la presencia de diferentes herpesvirus. Con respecto al posible papel de *S. aureus* previamente demostraron que los aislados subgingivales de PAG se caracterizan por tener un rico arsenal de factores virulencia y de patogenicidad en comparación con aislamientos supragingivales.

- McCormack y colaboradores en el 2015 indicaron que el papel de *Staphylococcus aureus* intraoral en las enfermedades bucales y como fuente de infección cruzada es polémico. Ellos realizaron un análisis de 10 años (1998-2007) de aislamientos de *S. aureus* de muestras clínicas orales y periorales del Laboratorio de Microbiología Oral, Glasgow Dental Hospital de Gran Bretaña. Encontraron que de las 11, 312 muestras que fueron enviadas al laboratorio durante el período de estudio, 1,986 correspondieron a cepas de *S. aureus* (18%). De estas, 1,782 (90%) eran *S. aureus* Sensibles a la Meticilina (MSSA) y 204 (10%) eran *S. aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA). Estos resultados sugieren que *S. aureus* se aísla frecuentemente en la cavidad oral y la región perioral y que la cavidad oral debe considerarse una fuente donde se encuentra *S. aureus* en términos de infección cruzada y diseminación a otros sitios del cuerpo. El papel de *S. aureus* en la patogénesis de ciertas enfermedades orales debería también ser considerada como parte de un diagnóstico diferencial.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *S. aureus* asociadas a infecciones periodontales poseen y expresan los genes de adhesión *fnbA*, *fnbB*, *spa*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *bbp*, *ebpS*, *map/eap*, *sdrC*, *sdrD*, y *sdrE*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar los patrones de expresión de genes de adhesión en un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de infecciones periodontales.

4.2 Objetivos particulares

- I. Identificar por la PCR los principales genes de adhesión en un grupo de *S. aureus* aislados de infecciones periodontales.
- II. Mostrar la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en cada una de las cepas de *S. aureus* por la técnica de Kirby Bauer.
- III. Determinar la expresión de los genes de adhesión de las cepas de *S. aureus* por la PCR en tiempo real en cultivos de células humanas infectadas.
- IV. Cuantificar la biopelícula formada por las cepas de *S. aureus in vitro*.
- V. Tipificar las cepas de *S. aureus* determinando la secuencia de nucleótidos de la región Xr del gen *spa*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Origen de las muestras

Las muestras se obtuvieron de un total de 268 pacientes que presentaban periodontitis avanzada, moderada o gingivitis. Los pacientes fueron de la clínica de Endoperiodontología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México y de una clínica dental de Tlahuac, Ciudad de México. El período de estudio fue de enero a diciembre de 2016. Este estudio se llevó a cabo con la aprobación de la Comisión de Ética y Bioseguridad FES Iztacala de la UNAM; número de aprobación 00012, marzo 18 del 2016 y con la firma de consentimiento informado de cada paciente.

Los pacientes que fumaban o recibieron tratamiento con antibióticos para la periodontitis en los últimos seis meses se excluyeron de este estudio. En este estudio se incluyeron pacientes con gingivitis que no tenían bolsa periodontales o con bolsas con profundidad menor a 3 mm, y a pacientes con periodontitis moderada o avanzada que tenían la bolsa periodontal mayor a 4 mm y con la pérdida de la inserción dental de 5 mm.

El personal de la clínica nos apoyó con la toma de las muestras, estas se tomaron con un hisopo estéril de las bolsas periodontales de más de cuatro mm de profundidad y también de la encía de los pacientes con gingivitis o de la bolsa con profundidad menor a 3 mm e inmediatamente se colocaron en caldo BHI (infusión cerebro corazón) (Bioxon®, México) y se incubaron a 37°C en condiciones aerobias por 24 h. Transcurrido este tiempo se sembraron en medios: Agar sangre, Sabouraud, S-110 (Staphylococcus Agar No. 110) y Eosina azul de

metileno (EMB) y se incubaron a 37°C por 24 h. Para la identificación de *S. aureus* se seleccionó una colonia con la morfología de esta especie (colonias pequeñas, blanquecinas, de forma circular, bordes redondeados, superficie lisa y convexa, algunas cepas producen un pigmento carotenoide que les da un color dorado) y se realizó Tinción de Gram; posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas: fermentación del manitol y coagulasa para las cuales son positiva en *S. aureus*. Las cepas identificadas de *S. aureus* se guardaron en caldo BHI con glicerol a 4°C.

También se seleccionó un grupo de 100 personas clínicamente sanas de acuerdo a la Especialista en Endoperiodontología Laura Ibeth Arredondo Velázquez y se le tomaron muestras siguiendo la metodología ya descrita en el párrafo anterior.

5.2 Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA genómico de las cepas de *S. aureus* se hizo con el método de ebullición que a continuación se describe. Posterior a obtener el crecimiento óptimo bacteriano a 37°C por 24 h en agar S-110 (*Staphylococcus* Agar No. 110, Bioxon® México) se tomó una colonia de cada cepa con un asa de siembra estéril y se depositó en un tubo con tapón de rosca de 16 x 150 mm estéril que contenía 2 mL de agua desionizada estéril Ultrapure™; el inóculo se mezcló vigorosamente con un Apollo Vortex Mixer® por 30 s y se llevó a ebullición durante 20 min, posteriormente los tubos se colocan en hielo (0°C) por 20 min. Un volumen de 1.5 mL fue depositado en un microtubo y se centrifugó en una microcentrífuga Microfuge Beckman Coulter™ durante 15 min; transcurrido el tiempo se desechó

la pastilla y se recuperó el sobrenadante, que contenía el DNA, en un microtubo de 1.5 mL estéril y se almacenó a -20°C para su posterior uso en la reacción de la PCR.

5.3 Identificación de *S. aureus* por los genes cromosómicos *RNAr23S*, *coa* y *nuc* por la PCR convencional

Las cepas de *S. aureus* se identificaron por la detección de los marcadores cromosómicos *23S rRNA*, *coa* y *nuc*. Los oligonucleótidos (Tabla 2) y las condiciones de la PCR (Tabla 3) para amplificar los genes fueron descritos por Nashev *et al.*, (2004). Para realizar la amplificación por PCR se utilizó la mezcla Kapa Taq Ready Mix™ 2X (Kapa Biosystems™) que contiene DNA polimerasa (0.5 u/μL), buffer de reacción con Mg²⁺ y 0.4 mM de (dNTPs) desoxinucleósidos trifosfatos como sustrato. Para llevar a cabo una reacción con un volumen total de 20 μL se mezclaron los siguientes componentes: 10 μL de Kapa Taq Ready Mix™, 1 μL (10 pmol) de cada oligonucleótido (integrated DNA technologies™) 5 μL de agua estéril libre de nucleasas y 3 μL (20 ng) de DNA genómico. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96. Como control positivo se utilizó el DNA genómico de la cepa de *S. aureus* ATCC 33592.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *S. aureus* mediante la amplificación de los genes *23S rRNA*, *coa*, *nuc* y *Spa X*.

Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>23Sr RNA</i>		ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC	1250	Nashev <i>et al.</i> , 2004
		AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC		
<i>coa</i>		ATA GAG ATG CTG GTA CAG G	Polimórfico 100 a 300	
		GCT TCC GAT TGT TCG ATG C		
<i>nuc</i>		GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	279	
		ACG CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC		
		CAC CAG GTT TAA CGA CAT		

Tabla 3. Condiciones de la PCR utilizadas para la identificación de los genes cromosómicos.

Gen	D1	C	D2	A	E1	E2
<i>23S rRNA</i>	95°C 3'	37	94°C 40"	64°C 1'	72°C 1.15'	72°C 3'
<i>coa</i>	95°C 3'	30	94°C 1'	58°C 1'	72°C 1'	72°C 3'
<i>nuc</i>	95°C 3'	37	94°C 1'	55°C 30"	72°C 30"	72°C 3'

D1: Desnaturalización 1; C: Ciclos; D2: Desnaturalización 2; A: Alineamiento; E1: Extensión 1; E2: Extensión 2.

5.4 Identificación de los genes codificados para adhesinas por la PCR convencional

Los oligonucleótidos (Tabla 4) y las condiciones de la PCR (Tabla 5) para amplificar los genes fueron descritos por Nashev *et al.*, (2004) y Campbell *et al.*, (2008). Para realizar la amplificación por la PCR se utilizó la metodología antes descrita. Como control positivo se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 33592.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los 11 genes de adhesinas de *S. aureus*.

Gen	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>fnbA</i>	GCGGAGATCAAAGACAA CCATCTATAGCTGTGTGG	1279	Nashev et al., 2004
<i>fnbB</i>	GGAGAAGGAATTAAGGCG GCCGTCGCCTTGAGCGT	812	
<i>clfA</i>	GGCTTCAGTGCTTGTAGG TTTTCAGGGTCAATATAAGC	Polimórfico 600 a 900	Campbell et al., 2008
<i>spa</i>	CAAGCACAAAAGAGGAA CACCAGGTTAACGACAT	Polimórfico 100 a 300	
<i>clfB</i>	AGAAATGTTCCGCGCCATTTGGTTT TGGCGGCAAATTTTACAGTGACAGA	404	
<i>cna</i>	ATATGAATTCGAGTATAAGGAAGGGG TTTGGATCCCTTTTTCAGTATTAGTAA	452	
<i>bbp</i>	ACCGTTGGCGTGTAACCTGCTG TCAAAGAAAAGCCAATGGCAAACG	500	
<i>ebpS</i>	CATTTTCCGGTGAACCTGAACCGTAG GCAAGTAATAGTGCTTCTGCCGCTTC	550	
<i>map/eap</i>	GCATGATAGAGGTATCGGGGAACGT TCCCTTGATCATTGGCCATTGCTG	655	
<i>sdrC</i>	GAAGTATCAGGGGTGAAACTATCCAC CGCATGGCAGTGAATACTGTTGCAGC	731	
<i>sdrD</i>	CCACTGGAAAATAAAGTTGAAGTTTCA CCTGATTTAACTTTGTCATCAACTGTA	467	
<i>sdrE</i>	GTCGCCACCGCCAGTGTCATTA GCAGCAGCGCATGACGGTAAAG	894	

Tabla 5. Condiciones de la PCR utilizadas para la identificación de los genes de las adhesinas de *S aureus*.

Gen	D1	C	D2	A	E1	E2
<i>fnbA</i>	95°C 5'	30	94°C 30"	50°C 30"	72°C 1'	72°C 8'
<i>fnbB</i>						
<i>clfA</i>	95°C 5'	35	94°C 1'	57°C 1'	72°C 1'	72°C 8'
<i>clfB</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>cna</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>bbp</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>ebpS</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>map/eap</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>sdrC</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>sdrD</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>sdrE</i>	95°C 15'	32	95°C 1'	60°C 1.3'	72°C 1'	72°C 10'
<i>spa X</i>	95°C 3'	30	94°C 1'	60°C 1'	72°C 1'	72°C 10'

D1: Desnaturalización 1; C: Ciclos; D2: Desnaturalización 2; A: Alineamiento; E1: Extensión 1; E2: Extensión 2.

5.5 Análisis de las muestras amplificadas por la PCR mediante electroforesis

Ya que se obtuvo la amplificación del ADN de los genes cromosómicos y los genes de las adhesinas, se ocuparon 3 µL de cada producto de la amplificación por la PCR (amplicones) para hacer el análisis por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante Midori Green (0.7%) (Nipon Genetics, Europe Gmph). La electroforesis se realizó a 120 V y 94 mA durante 90 min. Los geles de agarosa fueron fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100™ KODAK® (Paniagua *et al.*, 2007).

5.6 Detección del gen *mecA* en *S. aureus*

Se llevó a cabo la detección del gen que confiere la resistencia a la meticilina (*mecA*) en las cepas de *S. aureus* por la PCR punto final de acuerdo a lo descrito por Martín y colaboradores en el 2004 (Tabla 6). Para realizar la amplificación por la PCR se utilizó la metodología antes descrita. Las condiciones para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación a 66°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min); posteriormente 5 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 s, alineación a 64°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min) y 25 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 s, alineación a 50°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min). Se realizó una extensión a 72°C por 10 min y un enfriamiento a 4°C. Se utilizó como cepa control el DNA genómico de *S. aureus* ATCC 33592 *mecA*⁺ y como control negativo la cepa *S. aureus* ATCC 25923 *mecA*⁻. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para realizar la amplificación del gen *mecA* en cepas de *S. aureus*.

Gen	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>mecA</i>	GTA GAA ATG ACT GAA AGT CCG ATAA CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310	Martín <i>et al.</i> , 2004

5.7 Susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby Bauer

Para mostrar la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en cada una de las cepas de *S. aureus* se realizó la técnica de Kirby Bauer. Se tomó con un hisopo estéril 5 colonias de cada cepa crecidas en agar Mueller Hinton (MH) y se inocularon sobre toda la superficie del agar MH; con una pinza estéril se tomó un anillo con los 12 sensidisco que están impregnados del antibiótico (BIO-RAD) (Tabla 7) y se colocó sobre el agar MH; el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 h a 37°C. Dependiendo del diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier) las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte (tabla 7).

Tabla 7. Antibióticos utilizados contra las cepas de *S. aureus*.

CLAVE-Antibióticos	Diámetro del halo de sensibilidad en mm	
	R	S
(AM) Ampicilina	≥28	≤29
(CF) Cefalotina	≥14	≤18
(PE) Penicilina	≥28	≤29
(DC) Dicloxacilina	≥10	≤13
(CLM) Clindamicina	≥14	≤21
(TE) Tetraciclina	≥14	≤19
(SXT) Trimetoprim- sulfametoxazol	≥10	≤16
(CPF) Ciprofloxacina	≥15	≤21
(GE) Gentamicina	≥12	≤15
(E) Eritromicina	≥13	≤18
(CFX) Cefotaxima	≥14	≤23
(VA) Vancomicina	-----	≤15

R= resistencia y S= sensible

5.8 Secuenciación del gen *spa* región X por PCR convencional

Para obtener la secuenciación del gen *spa* región X se realizó primero la amplificación por la PCR de punto final de cada una de las cepas utilizando la mezcla Kapa Taq Ready Mix™ 2X (Kapa Biosystems™) que contiene DNA polimerasa (0.5 u/μL), buffer de reacción con Mg²⁺ y 0.4 mM de dNTPs (desoxinucleósidos trifosfatos) como sustrato. Se realizaron las reacciones en un volumen total de 40 μL, se mezclaron los siguientes componentes: 25 μL de Kapa Taq Ready Mix™, 2 μL (10 pmol) de cada oligonucleótido (integrated DNA technologies™) 5μL de agua estéril libre de nucleasas y 6 μL (20ng) de DNA

genómico. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96. Para checar la amplificación de los amplicones se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante Midori Green (0.7%) (Nipon Genetics, Europe Gmph). La electroforesis se realizó a 120 V y 94 mA durante 90 minutos. Los geles de agarosa fueron fotografiados bajo luz UV utilizando un fotodocumentador GEL LOGIC 100™ KODAK® (Paniagua *et al.*, 2007). Una vez confirmado se colocaron 20 µL de cada reacción de cada cepa en un microtubo de 1.5 mL estéril, en otro microtubo se colocaron 20 µL de oligonucleótidos del gen *spaX* y se almacenaron a -20°C. Las muestras se enviaron al laboratorio de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM.

5.9 Detección de la biopelícula en las cepas de *S. aureus* utilizando Agar Rojo Congo (ARC)

La detección de la formación de la biopelícula se realizó por el método descrito por Freeman *et al.*, (1989) que se basa en que los polisacáridos extracelulares se combinan específicamente con el colorante Rojo Congo. Las cepas de *S. aureus* se sembraron en placas de Agar Rojo Congo (ARC) [36 g de sacarosa (SIGMA); 0.8 g de Rojo Congo en un litro de agar de infusión cerebro corazón (BHI)] y se incubaron a 37°C por 24 h. Al término los resultados fueron interpretados de la siguiente manera: colonias negras o grises oscuras con una consistencia áspera, seca y cristalina sobre ARC, se clasificaron como cepas productoras de biopelícula mientras que las colonias muy rojas o rosas, fueron clasificadas como no productoras de biopelícula Freeman *et al.*, (1989). Como control positivo se

utilizó la cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 y como control negativo la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228.

5.10 Cuantificación de la formación de la biopelícula en las cepas de *S. aureus* utilizando el método de cristal violeta

Se realizó la cuantificación de la formación de la biopelícula en placas de microtitulación, de poliestireno estériles con 96 pozos (Sarsted, Barcelona, España) a cada pozo se les colocó 180 μ L de medio BHI y 20 μ L de inóculo de *S. aureus* ($A_{630nm}=1$). Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control negativo se utilizó caldo BHI sin inocular y como control positivo *S. epidermidis* ATCC 35984 (Cramton *et al.*, 1999). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. Los contenidos de cada pozo se aspiraron y las células que quedaron pegadas fueron fijadas con 200 μ L de metanol por 15 min. Después, las placas se secaron a temperatura ambiente expuestas al aire libre, posteriormente, cada pozo fue teñido con 150 μ L de cristal violeta Hucker's al 1% por 5 minutos. El exceso de tinción se eliminó mediante lavados con agua corriente. El colorante retenido por las bacterias adheridas fue recuperado con 150 μ L de ácido acético glacial al 33% (v/v). Las placas se colocaron en un lector de placas ELISA y se leyó su densidad óptica a 630 nm (Microplate Reader model 680; BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). A los resultados se les restó el valor del blanco (ácido acético al 30%) y se les multiplicó por la dilución (Fredheim *et al.*, 2009). De acuerdo al valor de la cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 formadora de biopelícula (2.0) se estableció el valor de la DO y se definió como la desviación estándar por la

dilución, por tanto las cepas se clasificaron como sigue: formadoras de biopelícula 1x DO, formadoras moderada de biopelícula 2x DO y 3x DO formadoras fuerte de biopelícula.

5.11 Infección del cultivo celular A549 con *S. aureus*: Preparación del inóculo bacteriano e inoculación

Schaller *et al.*, en el 2003 describió previamente el método de inoculación. Una colonia pura de cada cepa de *S. aureus* se sembró en tubos con 2 mL de caldo BHI (Bioxon®, México) y se incubaron por 24 h a 37°C en agitación constante. Después se realizaron diluciones 1:5 de los cultivos en caldo estéril de BHI hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 a 600 nm, lo que correspondió a una concentración de 1×10^9 células/mL.

Las células epiteliales de pulmón, de la línea A549, fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) las cuales fueron cultivadas con medio F12k suplementado con 10% de SFB incubadas a una atmósfera de 95% de humedad relativa a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Una vez alcanzado el 80% de confluencia las células epiteliales de pulmón fueron despegadas con tripsina-EDTA (In Vitro S.A., Cat. No. EN-008, México) y resembradas en placas de 12 pozos con una densidad celular de 200,000 células por pozo. Para inducir la expresión de las adhesinas en las cepas de *S. aureus* se depositó un inóculo de 50 μ L (1×10^9) del cultivo bacteriano en la superficie del cultivo celular.

5.12 Cosecha de *S. aureus* de la superficie del cultivo de la línea celular A549

Las bacterias se recolectaron de la superficie del cultivo de la línea celular tomando 300 μ L de cada pozo y colocándolos en microtubos con 500 μ L de PBS (phosphate buffer saline, solución 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): Las bacterias fueron homogeneizadas y lavadas mediante agitación suave en un vortex y al término se prepararon suspensiones bacterianas con 1×10^9 células/mL. Una suspensión con una concentración bacteriana de 1×10^9 células/mL de *S. aureus* correspondió a una DO de 0.4 a 600 nm. Los microtubos se centrifugaron a 8,000 rpm durante 2 min; el sobrenadante se decantó conservando la pastilla para la extracción de RNA (Green *et al.*, 2004)

5.13 Extracción del RNA de las cepas de *S. aureus*

Para llevar a cabo la extracción total de RNA se utilizó el estuche comercial MiniKit RNeasy (Qiagen Hilden, Germany) y el equipo robotizado QIAcube (Figura 2). A continuación se describen los pasos para utilizar el equipo QIAcube:

Las pastillas bacterianas que se obtuvieron de la infección celular fueron colocadas en la placa de agitación del equipo (Figura 8). Posteriormente en la posición “A” de la sección correspondiente al amortiguador de lisis se colocó el amortiguador TE (solución preparada a pH 8.0 con 10 mM Tris-Cl, 1 mM de EDTA y 1 mg/mL de lizosima). En la sección de reactivos del QIAcube se colocaron cada uno de los buffers del estuche RNeasy RLT (amortiguador de pH de lisis con isotiocianato de guanidina), RW1 (cloruro de guanidina y etanol) y RPE (amortiguador de pH de etanol), además del etanol al 95%. El contenedor del

equipo fue suministrado con puntas de 1mL. Posteriormente en el carrusel (centrifuga) del QIAcube se colocaron tubos de columna y de elución. Se realizó la programación del QIAcube para la extracción del RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida.

El primer paso que realizó el equipo robotizado QIAcube fue la lisis enzimática, para lo cual agregó 100 μ L de amortiguador TE (1 mg/mL de lizosima) a cada tubo con la pastilla celular bacteriana cosechada después de la infección de la línea celular A549. Los tubos fueron incubados en agitación a 25°C por 5 min.

Para inactivar las RNAsas y favorecer la unión del RNA a la membrana de sílica de los tubos de columna utilizada en el QIAcube, se adicionaron 350 μ L de amortiguador RLT (amortiguador de pH de lisis con isotiocianato de guanidina con 100 μ L/mL de β -mercaptoetanol). Posteriormente el equipo adicionó 350 μ L de etanol al 95% para homogeneizar el lisado, mezcló suavemente los tubos y transfirió 700 μ L de la mezcla a la columna contenida en un tubo de 2 mL. Los tubos fueron centrifugados durante 15 segundos y el líquido de flujo fue desechado. Se adicionaron 700 μ L del buffer de lavado RW1 (Cloruro de guanidina y etanol) a la columna para la eliminación de las biomoléculas no deseadas y centrifugó durante 15 segundos, nuevamente se desechó el líquido. Al término el QIAcube adicionó 500 μ L de amortiguador RPE (amortiguador de pH de lavado con 4 volúmenes de etanol al 96%) a la columna para eliminar los rastros de sales que se acumulan debido a los amortiguadores utilizados durante la corrida, el equipo centrifugó durante 15 s para lavar la membrana y el líquido de flujo se eliminó. Se adicionaron otros 500 μ L de amortiguador RPE a la columna y

se centrifugó durante 2 min para lavar la membrana, remover residuos de sales y desechar el líquido de flujo. Al término el equipo depositó la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL y centrifugó a durante 1 min. Por último el equipo adicionó 30 μ l de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y centrifugó por 1 min para obtener el RNA. La concentración y pureza del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El RNA es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a cDNA (DNA complementario).

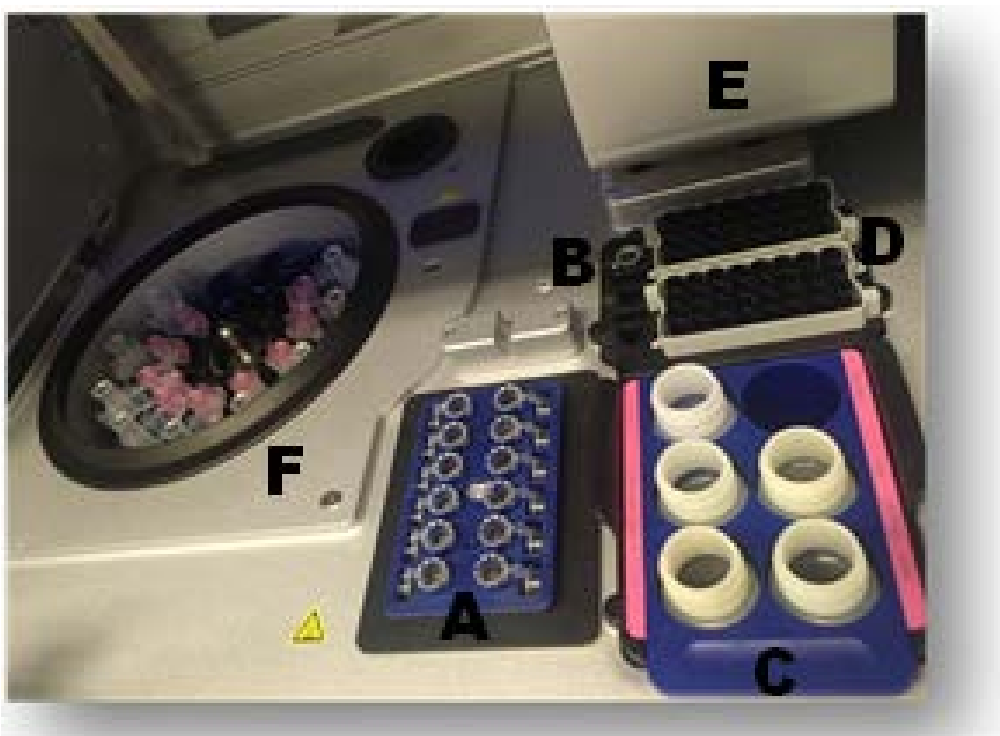


Figura 8. Interior del equipo QIAcube. **A.** Placa de agitación, **B.** Pozo para buffer de lisis, **C.** Posición para reactivos MiniKit RNeasy, **D.** Contenedor de puntas, **E.** Brazo robótico, **F.** Carrusel (centrífuga).

5.14 Transcripción reversa o síntesis del cDNA

Para llevar a cabo el proceso de la transcripción reversa de RNA a cDNA se utilizó el kit comercial QuantiTec Reverse Transcription (Qiagen®) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Primero se eliminó el DNA genómico, para lo cual se realizó una reacción por muestra en microtubos con un volumen final de 14 μL con los siguientes reactivos: 2 μL de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 μL de H_2O libre de RNAsas y 5 μL de RNA molde (200 ng/ μL). Esta reacción se incubó a 42°C durante 2 min y de inmediato se colocó en hielo. Posteriormente se preparó la mezcla de reacción para la transcripción reversa. En un microtubo se agregaron los reactivos correspondientes para realizar la síntesis de la primera cadena de cDNA: 1 μL de Quantiscript Reverse Transcriptasa® (Qiagen), 4 μL de Quantiscript RT buffer 5x®, 1 μL de RT Primer mix® y 14 μL de la reacción anterior (1ng de RNA molde) para un volumen final de reacción de 20 μL . Los tubos se incubaron a 42°C por 15 min posteriormente se incubaron en un termoblock a 95°C durante 3 min para inactivar la transcriptasa reversa. La concentración total del cDNA se midió en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

5.15 Expresión de los marcadores de virulencia por la PCR en tiempo real

Para obtener la expresión de los diferentes genes de virulencia se utilizó el equipo de la PCR en tiempo real Corbette® (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μL : 12.5 μL del estuche de PCR Rotor-Gene SYBR Green® (QIAGEN), 1 μL del oligonucleótido *forward* (10 pmol), 1 μL del oligonucleótido *reverse* (10 pmol; Tablas 1, 3 y 4), 9.5 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de cDNA templado (500 ng/ μL). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de activación de la HotStart Taq Plus ADN polimerasa a 95°C durante 5 min y 40

ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 s, y la combinación de alineación /extensión a 60 °C por 10 s.

En cada uno de los ensayos de la PCR en Tiempo Real se utilizó el gen 23S rRNA como *House Keeping* (gen constitutivo). También se incluyó una curva de calibración del control positivo (cDNA de cepas portadoras del gen a analizar) y dos NTC (no control templado) como controles negativos. La curva de calibración se preparó de la siguiente manera: a partir del control positivo (portador de un gen en particular con concentración de 2000 ng/ μ L) se realizó una primera dilución con agua libre de DNAsas y RNAsas Ultrapure™ (invitrogen) 1:2 (1000 ng/ μ L), a partir de esta dilución se hizo una segunda dilución 1:2 (500 ng/ μ L) y de ésta dilución se realizó una última dilución 1:2 (250 ng/ μ L).

A partir de la curva de calibración, el equipo de la PCR en tiempo Real determinó el número de copias del cDNA basado en el número de ciclos que ocurrieron para que la señal alcanzará el nivel de fluorescencia denominado ciclo umbral o Ct por sus siglas en inglés (*threshold cycle*), el cual interceptó la curva en la fase exponencial y fue determinado automáticamente por el software del equipo. Para cada Ct de las muestras y con base en las curvas de calibración, al final el software generó el número de copias obtenidas en la PCR en tiempo real. La curva de disociación (*melting curve*) se realizó en cada corrida de la PCR en tiempo real.

6. RESULTADOS

6.1 Pacientes con enfermedad periodontal

Se analizaron muestras de 268 pacientes con enfermedad periodontal que acudieron al servicio de especialidad de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala y de la clínica de Tlahuac, Ciudad de México. El 57% (n=152) fueron mujeres y el 43% (n=116) restante fueron hombres (Figura 9).

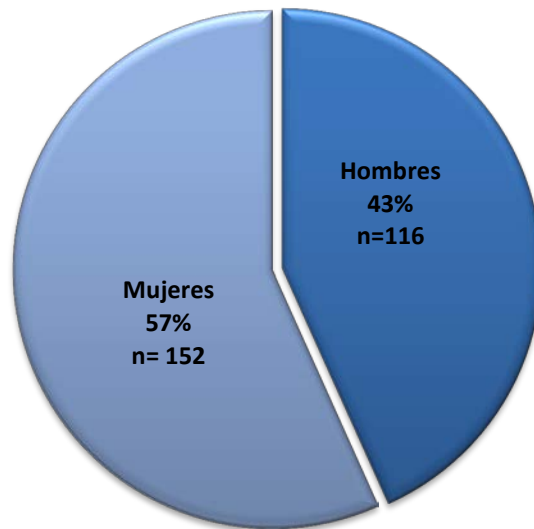


Figura 9. Distribución de pacientes con enfermedad periodontal

El intervalo de edad de 51 a 60 años con 24.3 % (61) fue el mayor de los pacientes con periodontitis, seguido de 41 a 50 años con 21.9 % (55), y de 61 a 70 años 19.5 % (49). El rango de 81 a 90 años fue el menor con el 1.6 % del padecimiento (Figura 10).

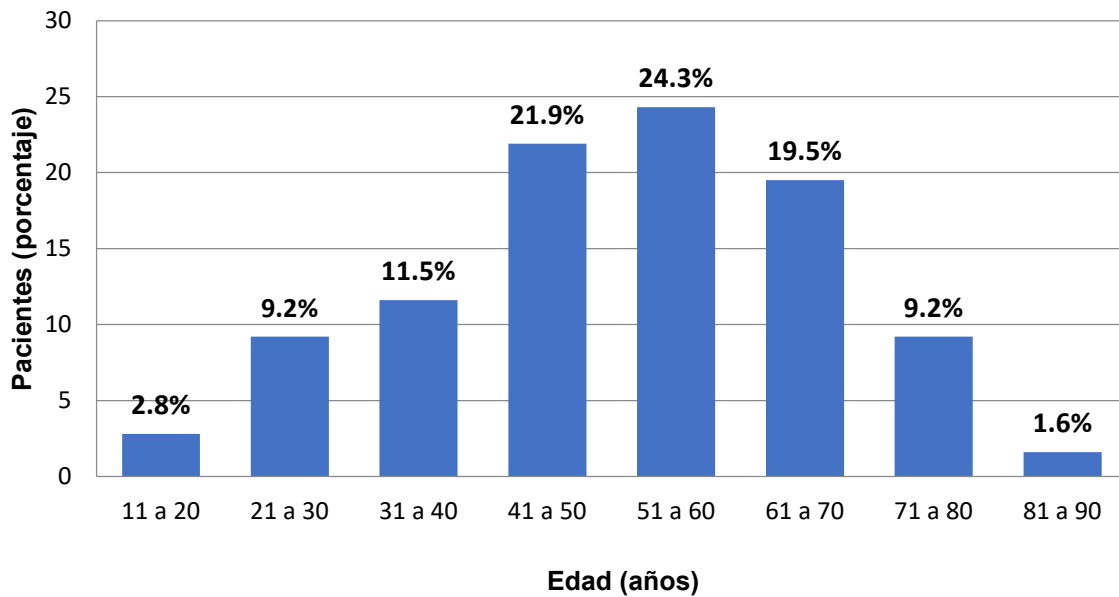


Figura 10. Edad de los pacientes con enfermedad periodontal.

El diagnóstico de los pacientes con enfermedad periodontal más frecuente fue el de periodontitis moderada con el 60.4% (n=162), seguido de periodontitis avanzada con el 34% (n=91) y la de menor frecuencia fue para gingivitis con 5.6% (n= 15) (Figura 11).

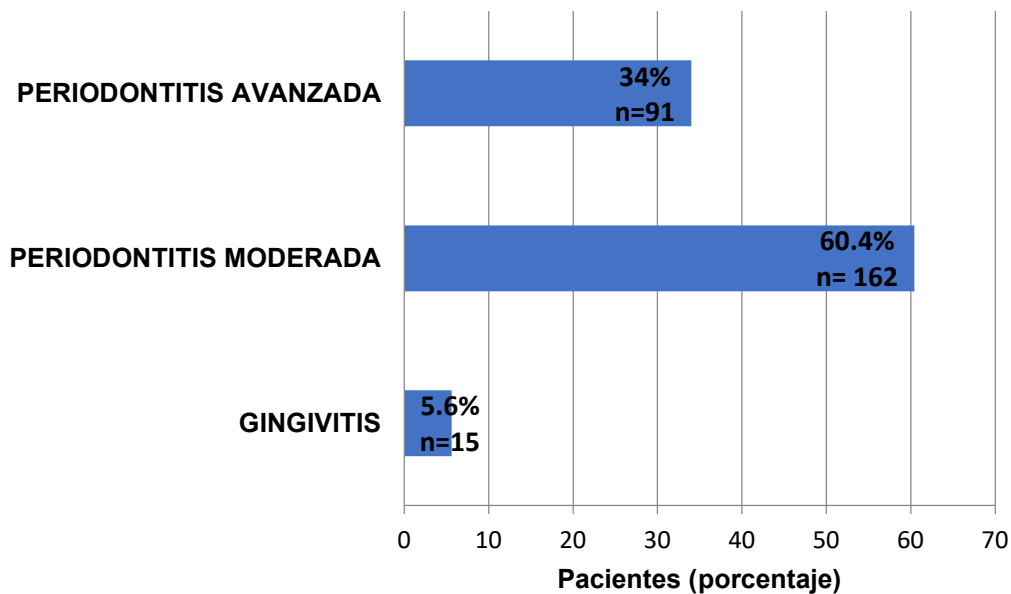


Figura 11. Diagnóstico de los 268 pacientes con enfermedad periodontal.

6.2 Grupo control de individuos sin lesión periodontal

Se analizaron 100 individuos (N=100) donde el 63% (n= 63) fueron mujeres y el 37% (n= 37) hombres (Figura 12). La mayoría de los participantes (93%, n= 93) fueron jóvenes menores a los 30 años de edad (Figura 13).

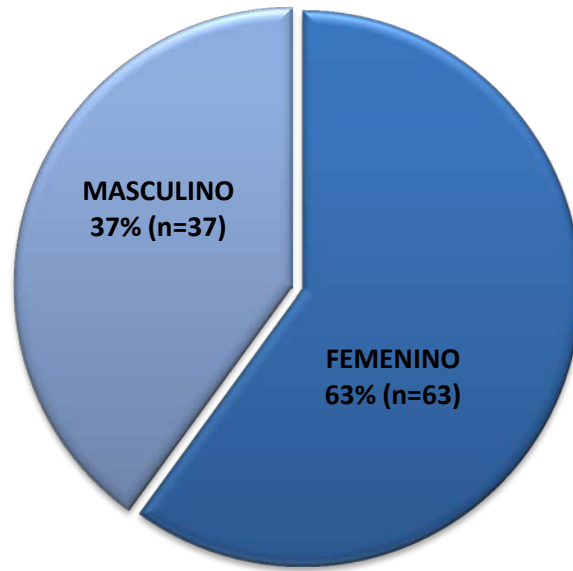


Figura 12. Distribución del sexo del grupo control.

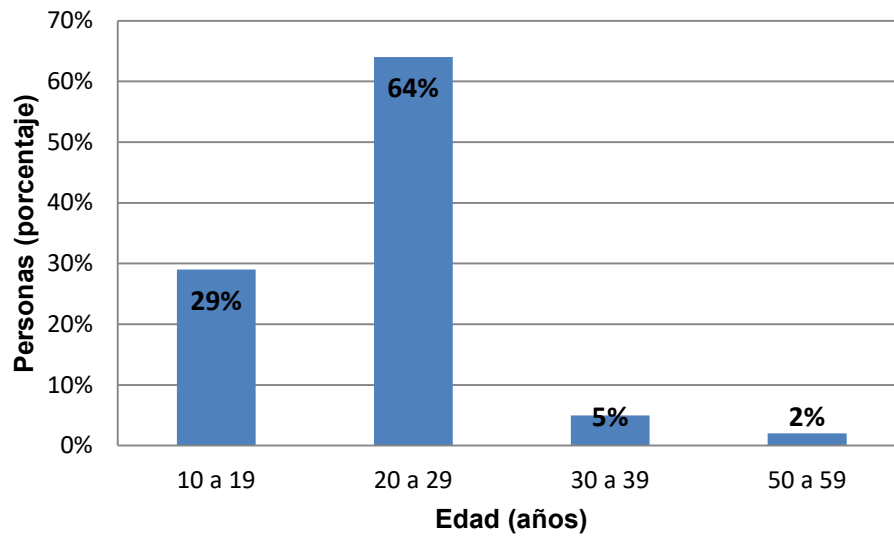


Figura 13. Distribución de la edad del grupo control.

6.3 Identificación de *S. aureus* por pruebas bioquímicas y por la PCR

A partir de los pacientes estudiados con enfermedad periodontal (n=268), la especie *S. aureus* fue identificada por pruebas bioquímicas (manitol +, coagulasa +) y mediante la PCR (Figuras 14-16; 23S *rRNA*, *coa* y *nuc*) en el 18.6% (n=50) de los pacientes (Tabla 8).

También se encontraron otros microorganismos asociados a la enfermedad periodontal de los pacientes como *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Candida* spp. (estos datos fueron proporcionados por personal del laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI FES-I) (Tabla 8).

Tabla 8. Microorganismos encontrados en pacientes con lesión periodontal.

Microorganismos	Número de pacientes (n=268)	Porcentaje
<i>S. aureus</i>	50	18.6
<i>S. epidermidis</i>	111	41.4
<i>C. albicans</i>	80	29.8
<i>E. coli</i>	50	18.6
<i>Klebsiella</i> spp.	13	4.8
<i>Candida</i> spp.	2	0.7

En el grupo control (N=100) *S. aureus* fue identificado por pruebas bioquímicas (manitol +, coagulasa +) y PCR (Figura 8 -11; 23S *rRNA*, *coa*, *nuc* y *spa* región X) en el 10% de los individuos (n=10). Los microorganismos asociados fueron *S. epidermidis* (n=13) y *Candida albicans* (n=9) (Tabla 9).

Tabla 9. Microorganismos encontrados en el grupo control.

Microorganismo	Número de cepas	Porcentaje
<i>S. aureus</i>	10	10
<i>S. epidermidis</i>	13	13
<i>C. albicans</i>	9	9

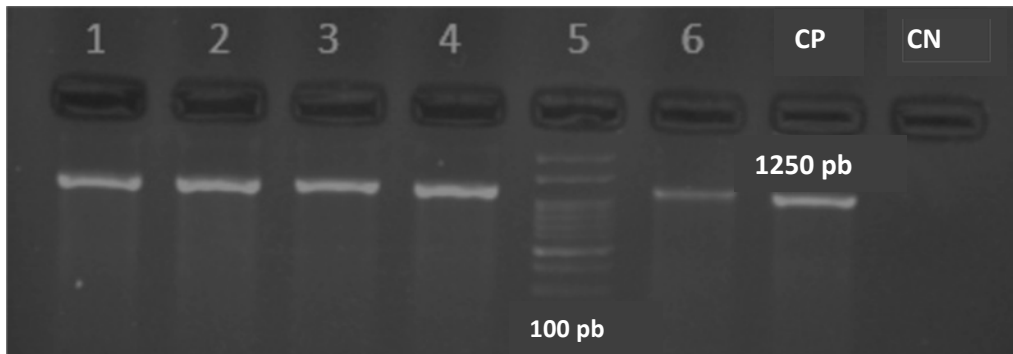


Figura 14. Detección del gen 23S *rRNA* (1250 pb) por PCR. Carriles 1,2 y 3 gen 23S *rRNA* en cepas de *S. aureus* de pacientes con lesión periodontal; carriles 4 y 6 gen 23S *rRNA* en cepas de *S. aureus* del grupo control; carril 5 marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); control negativo (sin DNA molde).

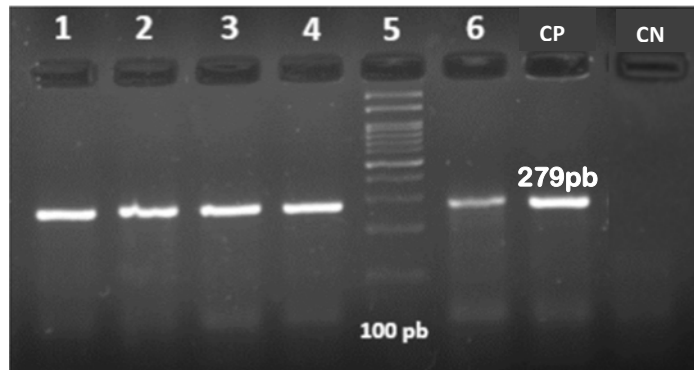


Figura 15. Detección del gen *nuc* (279 pb) por PCR. Carriles 1,2 y 3 *nuc* en cepas de *S. aureus* de pacientes con lesión periodontal; carriles 4 y 6 gen *nuc* en cepas de *S. aureus* del grupo control; carril 5 marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); control negativo (sin DNA molde).

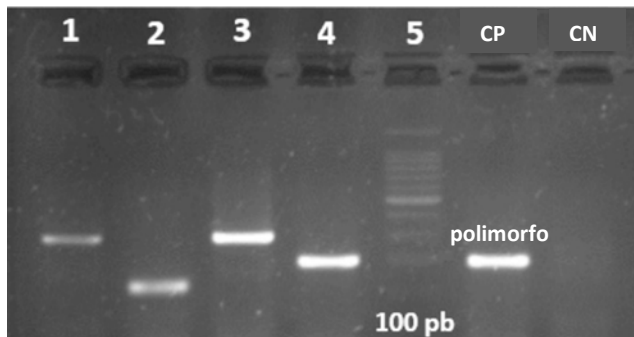


Figura 16. Detección del gen *coa* (polimorfo) por PCR. Carriles 1 y 2 *coa* (300 y 100 pb) en cepas de *S. aureus* de pacientes con lesión periodontal; carriles 3 y 4 *coa* (300 y 200 pb) en cepas de *S. aureus* del grupo control; carril 5 marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); control negativo (sin DNA molde).

6.4 Sexo, edad y diagnóstico de los pacientes con enfermedad periodontal asociada a *S. aureus*

El 64% (n=32) de los pacientes con enfermedad periodontal que presentó a *S. aureus* (n=50) correspondió al sexo femenino y el 36% (n=18) al sexo masculino (Figura 17). Los grupos de edad más abundantes fueron de 50 a 59 (28% n=14), 20 a 29 años (26% n=13) y 60 a 69 años (20% n= 10) (Figura 18).

El porcentaje del diagnóstico de la lesión periodontal más frecuente entre los pacientes estudiados fue periodontitis moderada (52%; n=26), seguida de periodontitis avanzada (26%, n= 13), y gingivitis (22%; n=1) (Figura 19).

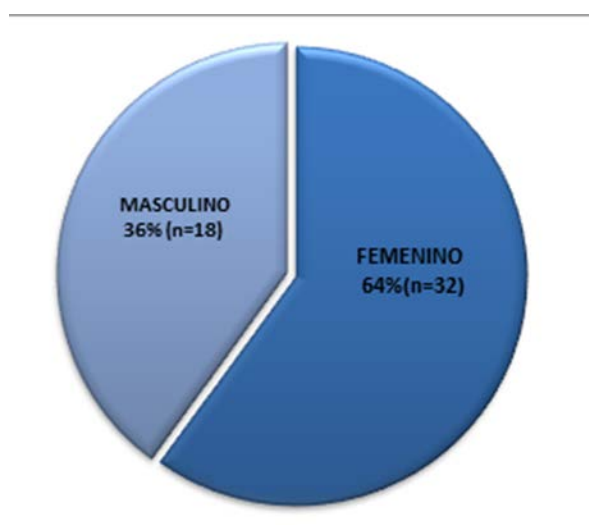


Figura 17. Distribución del sexo de los pacientes con lesión periodontal.

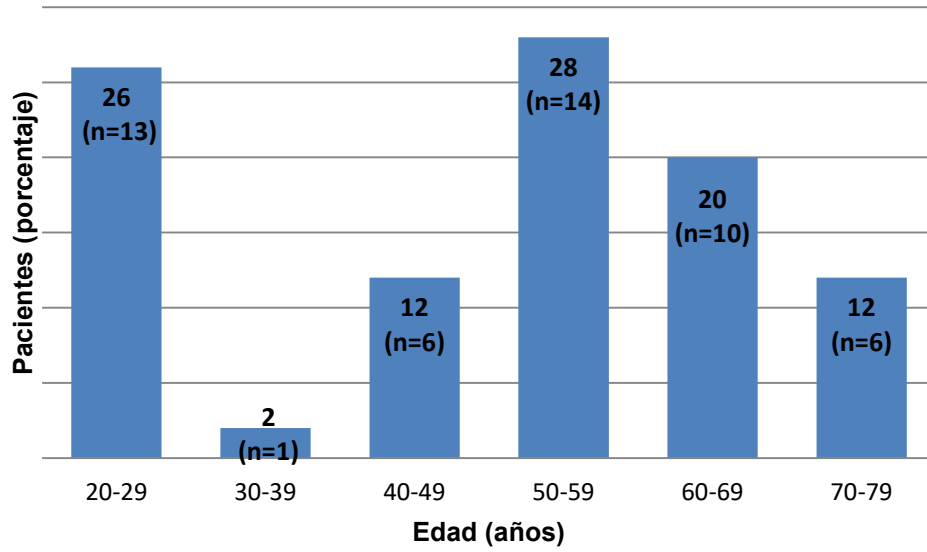


Figura 18. Distribución por edad de los pacientes con lesión periodontal.

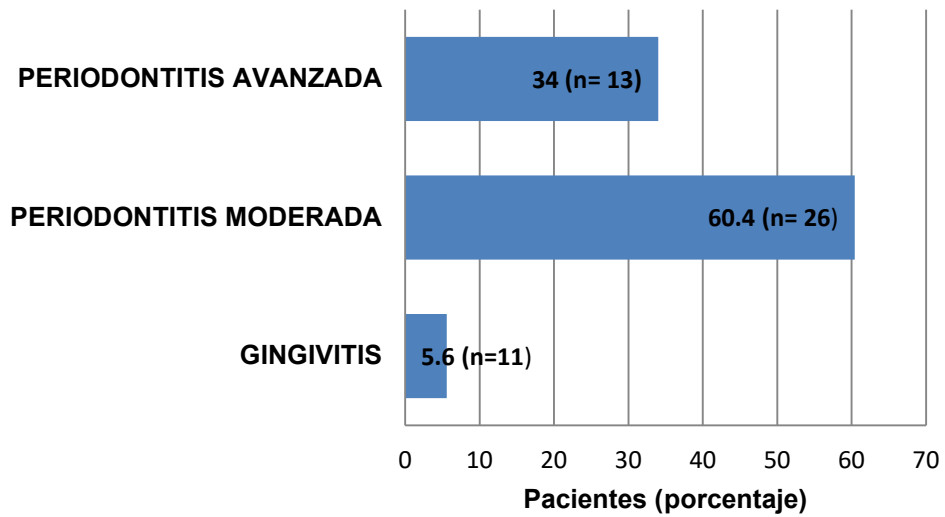


Figura 19. Diagnóstico de la lesión periodontal en los pacientes.

6.5 Sexo, y edad de los individuos sanos (N=10) portadores de *S. aureus*

El 70% (n=7) de los individuos sanos fueron mujeres y el 30% (n=3) hombres (Figura 20). El rango de edad más frecuente fue de 20-29 años (60%, n=6) y 10 a 19 (30%, n=3) (Figura 21).

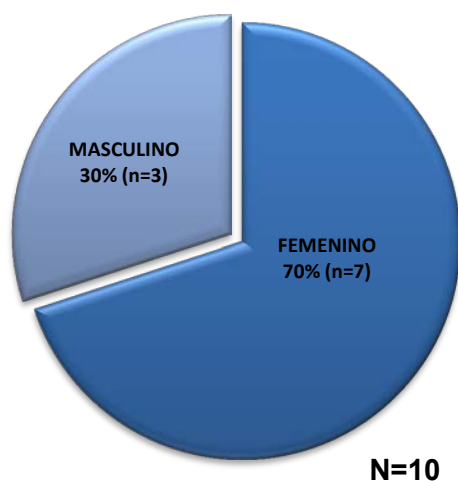


Figura 20. Distribución del sexo del grupo control (sin lesión periodontal).

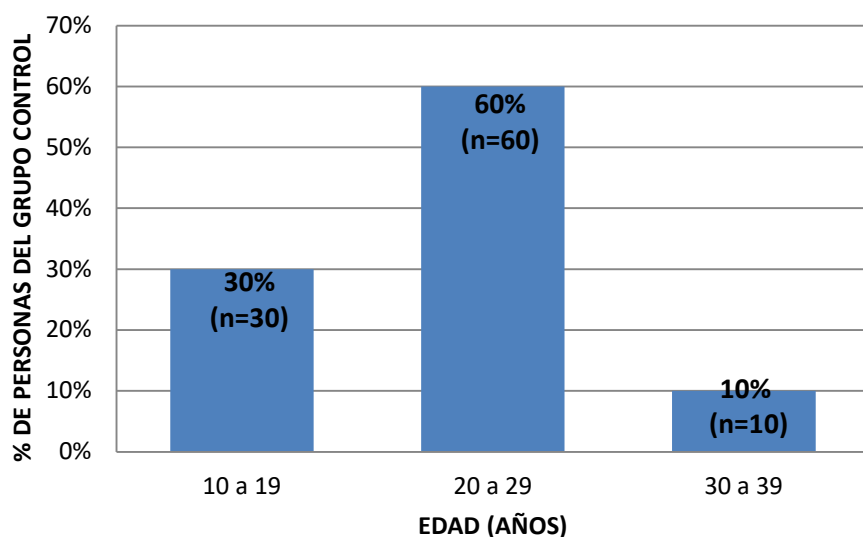


Figura 21. Distribución por edad de los pacientes sin lesión periodontal (N=100).

6.6 Identificación del gen *mecA* (resistencia a la meticilina) en las cepas de *S. aureus*

El 100% (n=50) de las cepas de *S. aureus* fue portadora del gen *mecA* que le confiere la resistencia a la meticilina (Meticilina Resistente SA; Figura 22).

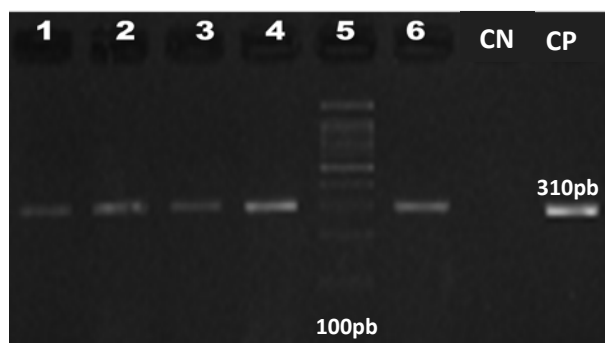


Figura 22. Detección del gen *mecA* (310 pb) por PCR. Carriles 1-4 y 6 en cepas de *S. aureus* de pacientes con lesión periodontal; carril 5 marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo; control negativo (sin DNA molde).

6.7 Resistencia a los antibióticos en las cepas de *S. aureus*

Todas las cepas de (n=50) *S. aureus* MRSA fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos, ampicilina, dicloxacilina, cefotaxima y penicilina, y la mayoría fue resistente a cefalotina (n=96), gentamicina (n=88) y eritromicina (n=86) (Tabla 10). El cien por ciento de las cepas MRSA (n=50) fue multiresistente a los antibióticos en el rango de seis a doce; una cepa (2%) fue resistente a seis antibióticos, nueve cepas (18%) a ocho antibióticos, siete (14%) a nueve antibióticos, quince (30%) a diez antibióticos, once (22%) a once antibióticos y siete cepas (14%) a doce antibióticos.

El 100% (n=10) de las cepas de *S. aureus* del grupo control fueron resistentes a los antibióticos penicilia, ampicilina y cefalotina; la mayoría fue resistente a

dicloxacilina 90% (n=9), clindamicina 80% (n=8), tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol 70% (n=7) Ciprofloxacina 60% (n=6). (Tabla 11).

Tabla 10. Resistencia de las cepas de *S. aureus* de los pacientes con enfermedad periodontal.

Antibióticos	No. de cepas (N=50)	Resistencia (%)
Ampicilina	50	100
Dicloxacilina	50	100
Cefotaxima	50	100
Penicilina	50	100
Cefalotina	48	96
Gentamicina	44	88
Eritromicina	43	86
Pefloxacina	37	74
Tetraciclina	36	72
Trimetoprim-sulfametoxazol	36	72
Levofloxacina	30	60
Cefuroxima	21	42

Tabla 11. Resistencia de las cepas de *S. aureus* de los pacientes del grupo control.

Antibióticos	No. de cepas (N=10)	Resistencia (%)
Ampicilina	10	100
Cefalotina	10	100
Penicilina	10	100
Dicloxacilina	9	90
Clindamicina	8	80
Tetraciclina	7	70
Trimetoprim- sulfametoxazol	7	70
Ciprofloxacina	6	60
Gentamicina	5	50
Eritromicina	3	30
Cefotaxima	3	30
Vancomicina	2	20

6.8 Detección de la biopelícula en las cepas de *S. aureus* utilizando Agar Rojo Congo (ARC)

Las cepas aisladas de *S. aureus* del grupo de pacientes con gingivitis formaron el 20% (n=10) de biopelícula en el agar rojo congo (ARC) (Tabla 12), las cepas aisladas de periodontitis moderada formaron el 40% (n=20) biopelícula y las cepas aisladas de periodontitis avanzada el 24%(n=12) formó biopelícula en el CRA. Sólo el 16% (n=8) de las cepas no formó biopelícula

Las cepas de *S. aureus* aisladas del grupo control formaron el 70% (n=7) biopelícula en el ARC (Tabla 11). El 30% (n=3) de las cepas no formó biopelícula.

Tabla 12. Cepas de *S. aureus* formadoras y no formadoras de biopelícula en Agar Rojo Congo (ARC).

Diagnóstico	Formadoras de biopelícula		No formadoras de biopelícula		Total (n=50)	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
Gingivitis (n=11)	10	20	1	2	11	22
Periodontitis moderada (n=26)	20	40	6	12	26	52
Periodontitis avanzada (n=12)	12	24	1	2	13	26
					Total (n=10)	
Grupo control (n=10)	7	70	3	30	10	100

6.9 Detección en placa de poliestireno de la biopelícula en las cepas de *S. aureus* utilizando Cristal Violeta

El 88% (n=50) de las cepas de *S. aureus* de pacientes con enfermedad periodontal formó biopelícula (color morado, amarillo y marrón Fig. 23) y el 12% (n=6) no formó biopelícula (color verde claro Figura 23). Para las cepas del grupo control el 90%(n=10) formó biopelícula (color morado, amarillo y marrón Fig. 23) y el 10% no formó (color verde claroFigura 23). Enel total de las cepas el 78% (n=39) fue formadora de biopelícula (color morado en la Fig. 23), el 22% (n=11) de las cepas fueron formadoras moderadas de biopelícula (color amarillo en la Fig. 23) y el 6% (n=3) de las cepas fueron formadoras fuertes de biopelícula (color marrón en la Fig. 23).

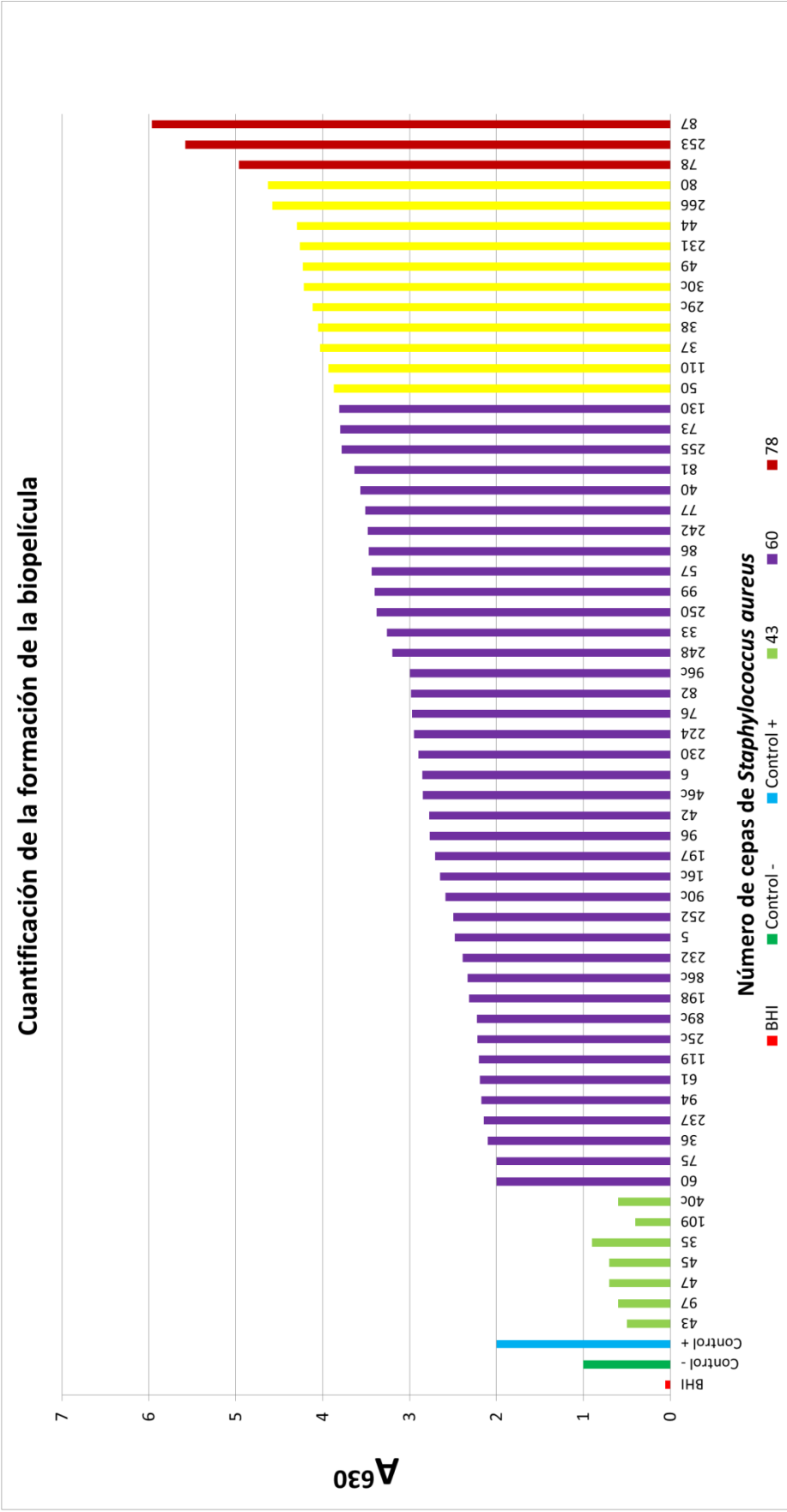


Figura 23. Determinación de la biopelícula con cristal violeta de cepas de *S. aureus*.

6.10 Detección y expresión de los marcadores de virulencia en las cepas de *S. aureus* de los pacientes con enfermedad periodontal

De manera global se encontró que los genes de virulencia detectados y expresados (detectados/expresados) con mayor frecuencia en las cepas de *S. aureus* (n=50), respectivamente, fueron para *spa* (50/45), *coa* (50/30), *clfB* (48/19), *ebps* (44/44), *sdrC* (32/29), y *sdrD* (44/44) (Tabla 13). La detección y expresión de estos marcadores fue evidente entre las cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes con periodontitis moderada, con relación a la P. avanzada y gingivitis. Los porcentajes de detección y expresión, respectivamente, fueron muy similares para *fnbA* (56%/46%), *fnbB* (30%/28%), *cna* (32%/32%), *bbp* (52%/50%), *map/eap* (56%/54%) y *sdrE* (36%/36%), de igual manera fueron predominantes en las cepas recuperadas de periodontitis moderada (Tabla 13).

En particular para el caso del grupo de gingivitis se detectaron con mayor frecuencia los genes *spa*, *coa*, *clfB* e *icaAB* (11/50) pero de estos solo se expresaron *spa* y *coa* (9/50). Mientras que para las cepas del grupo de periodontitis moderada la frecuencia fue de 26/50 para los genes *spa*, *coa*, *icaAB* y de 25/50 para cada uno de los genes *clfB* y *sdrD*, pero en la expresión la frecuencia fue para *ebps* y *sdrD* 25/50, para *spa* 24/50 y *coa* 21/48. Por otra parte para el grupo de periodontitis avanzada los genes *spa*, *coa*, *ebps*, *sdrD* e *icaAB* se detectaron en 13/50, *clfB* con 12/50 y para la expresión *ebps* y *sdrD* con 13/50 seguido de *spa* 12/50 y *coa* 10/50.

Tabla 13. Detección y expresión de los genes de virulencia de las cepas de *S. aureus* aisladas de lesión periodontal.

Gen	Porcentaje de detección			Porcentaje de expresión				
	Gingivitis No. (%)	Periodontitis Moderada No. (%)	Periodontitis Avanzada No. (%)	Total (n=50) No. (%)	Gingivitis No. (%)	Periodontitis Moderada No. (%)	Periodontitis Avanzada No. (%)	Total (n=50) No. (%)
spa	11 (22)	26 (52)	13 (26)	50 (100)	9 (18)	24 (48)	12 (24)	45 (90)
coa	11 (22)	26 (52)	13 (26)	50 (100)	9 (18)	21 (42)	10 (20)	40 (80)
fnbA	6 (12)	16 (32)	6 (12)	28 (56)	5 (10)	13 (26)	5 (10)	23 (46)
fnbB	4 (8)	7 (14)	4 (8)	15 (30)	3 (6)	7 (14)	4 (8)	14 (28)
clfA	3 (6)	6 (12)	4 (8)	13 (26)	3 (6)	6 (12)	4 (8)	13 (26)
clfB	11 (22)	25 (50)	12 (24)	48 (96)	7 (14)	7 (14)	5 (10)	19 (38)
cna	1 (2)	8 (16)	7 (14)	16 (32)	1 (2)	8 (16)	7 (14)	16 (32)
bbp	5 (10)	12 (24)	9 (18)	26 (52)	5 (10)	12 (24)	8 (16)	25 (50)
ebps	6 (12)	25 (50)	13 (26)	44 (88)	6 (12)	25 (50)	13 (26)	44 (88)
map/eap	8 (16)	12 (24)	8 (16)	28 (56)	8 (16)	10 (20)	9 (18)	27 (54)
sdrC	6 (12)	17 (34)	9 (18)	32 (64)	5 (10)	15 (30)	9 (18)	29 (58)
sdrD	6 (12)	25 (50)	13 (26)	44 (88)	6 (12)	25 (50)	13 (26)	44 (88)
sdrE	2 (4)	11 (22)	5 (10)	18 (36)	2 (4)	11 (22)	5 (10)	18 (36)
icaAB	11 (22)	26 (52)	13 (26)	50 (100)	2 (4)	7 (14)	6 (12)	15 (30)

El gen *icaAB* fue detectado en todas las cepas (n=50), sin embargo no se expresó en ninguna de las cepas de *S. aureus* después de la infección de la línea celular epitelial A549.

Grupo control, los genes de virulencia detectados y expresados con mayor frecuencia en las cepas de *S. aureus* (n=10) de este grupo control, respectivamente, fueron para *spa* (10/9), *coa* (10/9), *clfB* (10/8), *ebps* (10/9) y *sdrD* (10/10) (Tabla 14). Los genes con menor frecuencia fueron *sdrE* (4/4), *map/eap* (3/1) y *fnbB* (3/1).

Tabla 14. Detección y expresión de los genes de virulencia de las cepas de *S. aureus* aisladas del grupo control.

Gen	Porcentaje de detección (n=10)	Porcentaje de expresión (n=10)
	No. (%)	No. (%)
<i>spa</i>	10 (100)	9 (90)
<i>coa</i>	10 (100)	9 (90)
<i>fnbA</i>	7 (70)	2 (20)
<i>fnbB</i>	3 (30)	1 (10)
<i>clfA</i>	9 (90)	8 (80)
<i>clfB</i>	10 (100)	8 (80)
<i>cna</i>	7 (70)	7 (70)
<i>bbp</i>	0 (0)	0 (0)
<i>ebps</i>	10 (100)	9 (90)
<i>map/eap</i>	3 (30)	1 (10)
<i>sdrC</i>	6 (60)	4 (40)
<i>sdrD</i>	10 (100)	10 (100)
<i>sdrE</i>	4 (40)	4 (40)

6.11 Patrones de expresión de genes de virulencia asociados al fenotipo de resistencia a antibióticos en las cepas periodontales de *S. aureus*

Se identificaron 24 diferentes patrones de expresión de genes de virulencia asociados al fenotipo de resistencia a los antibióticos en las cepas de *S. aureus* obtenidas de los pacientes con enfermedad periodontal (Tabla 14). El patrón No. 1 está representado por 8 cepas periodontales de *S. aureus*, y se encontró asociado a gingivitis (n=2), periodontitis moderada (n=3) y periodontitis avanzada (n=3), conformado por siete genes de virulencia y dos fenotipos de resistencia a los antibióticos. Mientras que el patrón No. 2 es representado por 4 cepas y se relacionó a gingivitis (n=2) y periodontitis moderada (n=2), conformado por 8 genes de virulencia y siete fenotipos de resistencia a los antibióticos. El patrón No. 8, representado por dos cepas (periodontitis avanzada), se encontró conformado por trece genes de virulencia y nueve fenotipos de resistencia a los antibióticos. Los porcentajes de expresión de los marcadores de virulencia asociados a la frecuencia de la resistencia a los antibióticos en las cepas periodontales de *S. aureus* fue mayor en los pacientes con periodontitis moderada.

Tabla 15. Patrones de genes de virulencia y fenotipo de resistencia a los antibióticos de cepas de *S. aureus* aisladas de lesión periodontal.

Número de patrones 4	Patrones de genes de virulencia y fenotipos de resistencia a antibióticos.	Diagnóstico				Número de cepas	%
		Número de cepas (n=50)					
		Gingivitis	P	P	Avanzada		
1	spa/coa/cfb/ebpS/sdrC/sdrD/icaAB/GE/DC	2	3	3	8	16	
2	spa/coa/fnbA/cfb/ebpS/sdrC/sdrD/icaAB/E/SXT/CTX/PEF/PE/GE/DC	2	2	0	4	8	
3	spa/coa/fnbA/cfb/cna/bbp/ebpS/sdrD/icaAB/E/AM/CTX/PEF/PE/TE/DC	0	2	2	4	8	
4	spa/coa/fnbA/fnbB/cfb/ebpS/sdrD/icaAB/E/AM/SXT/CTX/PE/TE/GE/DC	0	3	0	3	6	
5	spa/coa/fnbA/cfb/bbp/ebpS/map-eap/sdrC/sdrD/icaAB/AM/SXT/PE/LEV/TE/GE/DC	1	1	1	3	6	
6	spa/coa/cfb/cna/bbp/ebpS/map-eap/sdrC/sdrD/sdrE/icaAB/E/AM/SXT/CTX/CXM/PE/LEV/TE/GE/DC	0	0	2	2	4	
7	spa/coa/fnbA/cfb/cna/ebpS/map-eap/sdrC/sdrD/sdrE/icaAB/E/AM/SXT/CTX/CXM/PEF/PE/LEV/GE/DC	0	2	0	2	4	
8	spa/coa/fnbA/fnbB/cfb/cna/bbp/ebpS/map-eap/sdrC/sdrD/sdrE/icaAB/E/AM/SXT/CTX/PEF/PE/TE/GE/DC	0	0	2	2	4	
9	spa/coa/fnbA/cfb/cna/bbp/ebpS/map-eap/sdrC/sdrD/sdrE/icaAB/E/AM/CTX/PEF/PE/LEV/GE/DC	0	1	1	2	4	
10	spa/coa/fnbA/cfb/cna/bbp/ebpS/sdrC/sdrD/sdrE/icaAB/E/AM/SXT/CTX/CXM/PEF/PE/GE/DC	0	2	0	2	4	
11	spa/coa/cfb/bbp/ebpS/map-eap/sdrD/icaAB/CF/E/AM/CTX/PEF/PE/TE/GE/DC	0	1	1	2	4	
12	spa/coa/fnbB/cfb/bbp/ebpS/map-eap/sdrC/sdrD/sdrE/icaAB/AM/CTX/PEF/PE/LEV/DC	0	2	0	2	4	
13	spa/coa/fnbA/fnbB/cfb/map-eap/icaAB/AM/SXT/CTX/PEF/PE/TE/DC	2	0	0	2	4	
14	spa/coa/fnbB/cfb/map-eap/icaAB/AM/CTX/PEF/PE/DC	2	0	0	2	4	
15-24	Otras combinaciones	2	7	1	10	20	
Total		11	26	13	50	100	

^aCF cefalotina, E eritromicina, AM ampicilina, SXT trimetoprim-sulfametoxazol, CTX cefotaxima, CXM cefuroxima, PEF pefloxacina, PE penicilina, LEV levofloxacina, TE tetraciclina, GE gentamicina, DC dicloxacilina..

6.12 Tipificación de la región X del gen *spa*

En la tabla 16 se muestran los tipos de *spa* identificados después de realizar el análisis de la secuenciación de la región X. Los tipos de *spa* que se identificaron con mayor frecuencia fueron: t91 con el 20% (n=10), t189 con 18% (n=9) y t8 con el 10% (n=5). Los tipos de *spa* con menor frecuencia fueron t209, t675 y t458 con el 6% (n=3), cada uno, t2379 y t1079 con 4% (n=2), y t626, t3, t267, t078 y t6313 con el 2% (n=1), para cada uno.

El tipo de *spa* identificado en las cepas del grupo control fue t539 con el 40%(n=4).

Tabla 16. Tipificación de la región X del gen *spa* de las cepas de *S. aureus* del presente estudio.

t91	10 (20)	0.96	Estados Unidos
t189	9 (18)	0.58	Argentina, Canadá y Estados Unidos
t008	5 (10)	5.91	Argentina, Canadá, Chile y Estados Unidos
t209	3 (6)	0.18	Canadá y Estados Unidos
t675	3 (6)	0.00	-
t458	3 (6)	0.05	Colombia y Estados Unidos
t2379	2 (4)	0.01	-
t1079	2 (4)	0.01	-
t626	1 (2)	0.03	-
t3	1 (2)	8.77	Canadá y Estados Unidos
t267	1 (2)	0.33	Argentina y Estados Unidos
t078	1 (2)	0.29	Argentina, Chile y Estados Unidos
t6313	1 (2)	0.00	-
*t539	4 (40)	0.03%	Canadá y Estados Unidos

*tipo de *spa* de las cepas del grupo control

7. DISCUSIÓN

7.1 Pacientes estudiados

Se ha reportado que las enfermedades periodontales afectan hasta el 90 por ciento de la población mundial y que ocurren principalmente en países en desarrollo, sin llegar a ser severa en grupos indígenas (Pihlstrom *et al.*, 2005). La periodontitis desde la última década se considera un problema de salud pública en los países industrializados; en el caso de México se tiene el registro que del 50 al 70% de los adultos mexicanos la padecen (SeSa, 2016). En el presente estudio se analizaron 268 pacientes con enfermedad periodontal que acudieron al servicio de especialidad de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala, dentro de los cuales 152 (57%) fueron mujeres y 116 (43%) hombres (figura 9), lo cual discrepa con lo descrito por la Academia Americana de Periodoncia, que menciona que la frecuencia de padecer periodontitis es más alta en los hombres (56.4%) que en las mujeres (38.4%). El hecho de que en este trabajo la prevalencia de la enfermedad periodontal fue mayor en las mujeres puede deberse a que las mujeres tienden a ser más cuidadosas con su salud bucal según reportes de la Clínica de Endoperiodontología de la FESI. En este estudio la periodontitis moderada fue el diagnóstico más frecuente entre los pacientes estudiados (60.4%; n=162), seguido de la periodontitis avanzada (34%; n=91) y el de menor frecuencia fue la gingivitis (5.6%; n= 15) (Figura 11), principalmente en pacientes con edad comprendida entre 41-70 años (65.5%) (Figura 10). Estos resultados son semejantes a los encontrados en un grupo de pacientes colombianos con enfermedad periodontal (n=356), donde la periodontitis

crónica fue la más frecuente (56.7% n=202), seguida de la periodontitis agresiva (39.1% n=139) (Betancourt *et al.*, 2006).

7.2 Identificación de *S. aureus* en las infecciones periodontales

Se ha reportado que alrededor de unas 500 especies bacterianas aerobias y anaerobias son responsables de las enfermedades periodontales (Moore y Moore 1994), dentro de las cuales *S. aureus* se encuentra asociado a las infecciones dentoalveolares y a lesiones de la mucosa oral (Kim y Lee 2015; Aggour y Gamil 2017). En este trabajo *S. aureus* se identificó por métodos microbiológicos y moleculares en el 18.6% (n= 50) de las muestras de los pacientes con enfermedad periodontal (n= 268), coincidiendo con el 18% (n=154) encontrado en pacientes con periodontitis (Koukos *et al.*, 2015). Se ha descrito que la presencia de *S. aureus* en la periodontitis de los pacientes puede ocurrir por una infección cruzada entre el personal de atención odontológica, que son portadores de *S. aureus* en la cavidad oral o nasal y que infectan a los pacientes mediante contacto con piel o saliva en forma de aerosoles, o por contaminación de los instrumentos o de las unidades dentales (Kim 2012 y Kurita *et al.*, 2006). Por ejemplo, *S. aureus* ha sido aislado de superficies ambientales, manos, y carretes nasales de enfermeras, pacientes y dentistas (Khairalla *et al.*, 2017 y Han *et al.*, 2010). La frecuencia de *S. aureus* en las lesiones periodontales de los pacientes estudiados podría ser un factor condicionante para desarrollar otros padecimientos, por ejemplo, se ha reportado que la presencia de *S. aureus* en la saliva es un factor de riesgo para desarrollar neumonía por aspiración (Khairalla *et al.*, 2017).

En este estudio se encontraron otros organismos asociados a la enfermedad periodontal de los pacientes, que incluyeron cepas de *Staphylococcus epidermidis* (n=111), el hongo *Candida albicans* (n=80), *E. coli* (n=50) y *Klebsiella spp.* (n=13) (Tabla 8). Se ha reportado que *S. aureus* y *S. epidermidis* se encuentran asociados en pacientes con infección dental, particularmente abscesos, sin embargo, la frecuencia de *S. aureus* se ha incrementado significativamente en el periodonto después de la práctica quirúrgica con hiposalivación (Vellappally *et al.*, 2017). En este estudio se encontró que el 78% (n= 39) de las cepas de *S. aureus* fue aislado de pacientes con periodontitis moderada y avanzada (Figura 19), lo que reflejaría que la presencia de esta bacteria es más frecuente en pacientes con enfermedad periodontal prolongada, que en el caso de gingivitis, coincidiendo con lo descrito por Passariello y colaboradores (2017) quienes encontraron no solamente *Staphylococcus aureus* en pacientes con Periodontitis Agresiva Generalizada (PAG) y lesiones subgingivales, sino también asociaciones de patógenos como, *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Se sabe que estos microorganismos poseen factores de virulencia que podrían explicar la destrucción acelerada del tejido que caracteriza a la Periodontitis Agresiva generalizada (PAG).

7.3 Cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) en los pacientes estudiados.

El cien por ciento (n= 50) de las cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes con enfermedad periodontal fue portadora del gen *mecA* que confiere resistencia a la meticilina (MRSA). Este porcentaje es superior al 65.3% (n=98) de cepas MRSA

identificadas en la cavidad oral de pacientes con caries dental (Vellappally *et al.*, 2017), y a lo reportado en otros estudios para cepas de *S. aureus* de pacientes con enfermedad periodontal o de pacientes con otros trastornos dentales (Cuesta *et al.*, 2011 y Miao *et al.*, 2017). Si bien la presencia de cepas MRSA en infecciones orales se ha incrementado paulatinamente con los años en algunas zonas geográficas, en otras partes todavía se han encontrado porcentajes muy bajos, por ejemplo, en un estudio realizado durante 9 años (1998-2007) de muestreos (n= 11,312), se encontró que del total de cepas de *S. aureus* identificadas en la cavidad oral (n=1,986; 18%), únicamente el 10% (n=204) fue MRSA (McCormack *et al.*, 2015). La presencia de cepas MRSA en la enfermedad periodontal es un problema de salud importante que reduce el número de antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones, ocasionando la persistencia de esta bacteria en las lesiones, y por consiguiente pueden ocasionar otro tipo de infecciones, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (diabetes, cáncer, insuficiencia renal, etc.), por ejemplo se ha descrito en los Estados Unidos, que en el 2005 las infecciones invasivas por MRSA ocurrieron en una tasa en la población de diálisis del 42.5 /1000, incidencia que supera en 100 veces la de la población general (Center for Diseases Control 2007). La elevada presencia de cepas MRSA aisladas de los pacientes estudiados puede deberse a que cada vez es más frecuente que los dentistas sean portadores sanos de esta bacteria, por ejemplo en un estudio realizado en México en muestras nasales y faríngeas de 100 estudiantes de odontología con cinco a seis años de exposición a pacientes y 81 estudiantes no odontológicos, se encontró que el 20% de los estudiantes de odontología fueron portadores sanos de MRSA, en comparación

con el 5% de estudiantes no odontológicos. (Martínez-Ruíz *et al.*, 2014). También se encontró una incidencia del 8% de cepas MRSA en los teléfonos móviles de los estudiantes de odontología (8/100).

En el presente estudio todas las cepas de *Staphylococcus aureus* Resistentes a la Meticilina (MRSA n=50) aisladas de los pacientes con enfermedad periodontal fueron resistentes a los antibióticos betalactámicos penicilina, ampicilina, dicloxacilina, cefotaxima, y la mayoría fue resistente a cefalotina, gentamicina (aminoglucósido), eritromicina (macrólido), pefloxacina (quinolona), tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol (Tabla 10). Estos datos son preocupantes, no solamente porque refleja la elevada resistencia de las cepas MRSA a los antibióticos probados (Tabla 10), sino también porque demuestra que todas las cepas fueron multidrogo resistentes en el rango de seis a doce antibióticos, lo que reduce las opciones de tratamiento médico. La elevada resistencia a los antibióticos betalactámicos, así como también a la eritromicina, aminoglucósidos y tetraciclina detectada en las cepas MRSA (Tabla 10) puede deberse probablemente a la presencia del elemento genético móvil SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec), que incluye el gen *mecA*, que además de codificar para la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a) con baja afinidad por los β -lactámicos (Hartman *et al.*, 1984), también con frecuencia acarrea genes de resistencia como *blaZ*, que codifica para las enzimas β -lactamasas, confiriendo la resistencia a los antibióticos β -lactámicos; *ermA*, *ermB* y *ermC* que confieren resistencia a la eritromicina; *aac(69)-Ie-aph (20)-Ia*

responsable de la resistencia a los aminoglucósidos; y tet (M), tet (O) y tet (K) causantes de la resistencia a la tetraciclina (Rizzotti *et al.*, 2005).

En México existe poca información sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos en cepas periodontales de *S. aureus*, sin embargo estos resultados evidencian la multirresistencia bacteriana a estos agentes, debido probablemente a la transferencia horizontal de los genes de resistencia a los antibióticos mediante plásmidos, transposones (Lindsay 2014) e integrones (Xu *et al.*, 2011), por ejemplo, se ha descrito que el plásmido pT181 codifica para resistencia a tetraciclina en *S. aureus* y el gen *tet* (M) puede encontrarse en combinación con *ermB* en el transposón Tn916 (Chopra *et al.*, 2001). La resistencia a eritromicina, gentamicina, tetraciclina y sulfametoxazol en las cepas MRSA estudiadas (Tabla 10) coincide con la descrita en cepas MRSA aisladas de la cavidad oral (Buonavoglia *et al.*, 2010), y también con lo reportado por Palazzoa *et al.*, (2010), donde todas las cepas MRSA aisladas de saliva de una población de trabajadores de la salud fueron resistentes a penicilina y eritromicina. Si bien la frecuencia de la resistencia a los antibióticos en cepas MRSA de pacientes dentales de otros países ha sido extremadamente baja, o prácticamente nula, los porcentajes de resistencia a penicilina, ampicilina, eritromicina, dicloxacilina y trimetoprim-sulfametoxazol es semejante a lo descrito en cepas de MRSA aisladas de las fosas nasales anteriores y de los catéteres de pacientes con hemodiálisis. (Paniagua *et al.*, 2014a).

La alta frecuencia de cepas MRSA resistentes a los antibióticos quizás esté relacionada con la disponibilidad de antibióticos sin receta médica que había

estado ocurriendo en México hasta el 2010. Entre los antibióticos más comunes utilizados en el tratamiento periodontal están la penicilina, la tetraciclina y los macrólidos, por lo que los resultados encontrados en este estudio podrían servir para mejorar las alternativas de tratamiento con antibióticos para pacientes con periodontitis.

7.4 Detección y expresión de genes de virulencia en las cepas periodontales de *S. aureus*

La capacidad de *S. aureus* para adherirse a las células del epitelio humano mediante las MSCRAMMs (Componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva), se considera el primer paso en la colonización e invasión de las células del hospedero. En este estudio los genes de virulencia identificados y expresados con mayor frecuencia entre las cepas MRSA fueron *spa*, *coa*, *ebps*, *sdrD* y *sdrC* (Tabla 13), principalmente en los pacientes con periodontitis moderada; mientras que los genes menos frecuentes fueron *fnbB* y *clfA*. El hecho de que los genes de adhesión se hayan detectado y expresado con más frecuencia en las cepas MRSA aisladas de periodontitis moderada y avanzada puede deberse a que durante las etapas de infección más aguda (bolsas periodontales) las proteínas de adhesión podrían ligarse más frecuente a los tejidos del hospedero, facilitando la internalización, y la evasión del sistema inmune, ayudando de esta manera a la persistencia de la infección, además de ser claves en las funciones del metabolismo de la pared celular bacteriana. Se han descrito 34 adhesinas de superficie que presentan dominios plegados similares a los de la inmunoglobulina G unidos en tándem (uno con otro), que pueden unirse

a la matriz extracelular del hospedero reconociendo receptores en las proteínas como el fibrinógeno, colágeno, fibronectina y la sialoproteína ósea (Foster & Höök, 1998; Clarke & Foster, 2006; Paharik & Horswill, 2016).

La frecuencia de detección y expresión de genes de adhesión en cepas MRSA aisladas de enfermedad periodontal no había sido estudiada previamente, sin embargo, contrastan con los descritos previamente en cepas MRSA aisladas de fosas nasales y catéteres de pacientes en hemodiálisis, donde los genes más frecuentes fueron *spa*, *clfA*, *ebps*, *sdrC*, *sdrE*, *clfB*, *cna* y *sdrE* (Paniagua-Contreras *et al.*, 2014a). y también con los descritos en cepas MRSA y meticilina sensible *S. aureus* (MSSA) aisladas de infecciones de la piel de pacientes de diferentes áreas geográficas, donde los genes más frecuentes fueron *spa*, *clfA*, *clfB*, *bbp*, *ebps*, *sdrD*, *fnbB* y *sdrE* (Campbell *et al.*, 2008)

La alta frecuencia de genes de adhesinas de la familia MSCRAMMs (Componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva) identificados en las cepas MRSA, demuestra por un lado la virulencia de las cepas para coadyuvar en las infecciones persistentes y agudas, sobre todo en los pacientes con periodontitis moderada y avanzada, y por otro lado la capacidad de las cepas para diseminarse y adherirse a otros sitios anatómicos y causar otras infecciones, por ejemplo, la presencia de los genes *clfA*, *fnbA* y *cna* han sido identificados en cepas de *S. aureus* aisladas de portadores nasales (Nashev *et al.*, 2004), También se ha demostrado que la unión de la proteína Cna (codificada por el gen *cna*) al colágeno se asocia con la endocarditis y la queratitis (Hienz *et al.*, 1996 y Rhem *et al.*, 2000), las proteínas de unión a fibronectina (FnbA y FnbB)

median la adherencia de la bacteria al epitelio humano de las vías respiratorias (Mongodin 2002), mientras que la adhesión al fibrinógeno por ClfA y ClfB (factor de agregación A y B) juega un importante papel antifagocítico, contra neutrófilos y macrófagos (Palmqvist., *et al.*, 2004 y Higgins *et al.*, 2006). También se ha demostrado que la adhesina ClfB se une a las cadenas α del fibrinógeno y citoqueratina diez (CK10), esta última es una proteína estructural de las células epiteliales, por lo que la ClfB se asocia a la colonización de *S. aureus* al epitelio nasal (Walsh *et al.*, 2008).

La presencia de cepas de *S. aureus* en los pacientes estudiados, que además son portadoras de múltiples genes de adhesión (Tabla 13), como *icaAB* (n=50; 100%), podría ser un factor importante en la exacerbación de las infecciones dentales debido a la formación de biopelícula, coadyuvando con los patógenos principales de las infecciones periodontales (Aggour y Gamil, 2017). También se ha descrito que *S. aureus* podría formar parte de la microbiota en la biopelícula supragingival, lo que evidenciaría de manera importante la asociación entre *S. aureus* y la implantitis, considerada como una infección oral emergente (Thurnheer *et al.*, 2015).

En este trabajo el ochenta y ocho por ciento (n= 44) de las cepas analizadas formó biopelícula (Tabla 13), lo que demostraría la capacidad de estos patógenos para evitar la respuesta inmune del hospedero y la acción de los antibióticos, no únicamente de *S. aureus*, sino también de los otros microorganismos asociados con la biopelícula. La formación de la biopelícula permite la persistencia y la cronicidad de las infecciones, favoreciendo con ello la transferencia horizontal de

genes de resistencia a los antibióticos transmitidos por plásmidos (Savage *et al.*, 2013; Juhas 2015)

7.5 Patrones de expresión de genes de virulencia asociados al fenotipo de resistencia a los antibióticos en las cepas periodontales de *S. aureus*

Después de la infección *in vitro* de la línea celular epitelial humana A549 con las cepas de *S. aureus*, se encontró que la mayoría de las cepas fue capaz de expresar simultáneamente de 7 de 12 genes de virulencia, agrupándose de esta manera, en 24 diferentes patrones de expresión asociados con el fenotipo de resistencia a los antibióticos (Tabla 15). El patrón no. 1 (Tabla 15) conformado por siete genes de virulencia (*spa-coa-clfB-ebpS-sdrC-sdrD-icaAB*) relacionados al fenotipo de resistencia a dos antibióticos (GE-DC), se distribuyó en el 16% (n= 8) de las cepas periodontales de *S. aureus*, gingivitis (n=2), periodontitis moderada (n=3) y periodontitis avanzada (n=3). El patrón No. 2 representado por 8 genes de virulencia (*spa-coa-fnbA-clfB-ebpS-sdrC-sdrD-icaAB*) con un fenotipo de resistencia a siete antibióticos (E-SXT-CTX-PEF-PE-GE-DC) se encontró en un 8% (n=4) y se relacionó a gingivitis (n=2) y periodontitis moderada (n=2), mientras que el patrón No. 8, conformado por trece genes de virulencia (*spa-coa-fnbA-fnbB-clfB-cna-bbp-ebpS-mapeap-sdrC-sdrD-sdrE-icaAB*) y con un fenotipo de resistencia a nueve antibióticos (E-AM-SXT-CTX-PEF-PE-TE-GE-DC), representado con el 4% (n=2), periodontitis avanzada. Estos resultados son relevantes porque demuestran, por primera vez, el alto nivel de expresión de genes de virulencia relacionados a la resistencia a los antibióticos en cepas de *S. aureus* asociadas con enfermedad periodontal. Los diferentes perfiles de

expresión de genes implicados en la adhesión, invasión y evasión de la respuesta inmune, en combinación con la resistencia a los múltiples antibióticos, y formación de biopelícula; aumentan la agudeza y propagación de la infección (Foster *et al.*, 2014).

7.6 Tipificación de la región X del gen *spa* de *S. aureus*

En este trabajo se identificaron 13 tipos de *spa*, que no están reportados en México, de las 50 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con periodontitis, estos *spa* sólo se han reportado en algunos países del continente Americano (Tabla 16).

Los tipos de *spa* identificados que presentaron el mayor porcentaje en las cepas periodontales fueron t91 20% (n=50), t189 18% (n=50) y t008 con 10% (n=50). En el estudio realizado en los catéteres infectados de hemodiálisis de pacientes de México, los tipos de *spa* identificados para cepas de *S. aureus*, fueron t895, t008, t189 y t002 (Paniagua-Contreras *et al.*, 2014b), coincidiendo en dos de las cepas tipificadas por *spa* (t189 y la t008), lo que nos hace suponer que estas cepas periodontales de *S. aureus* analizadas en este estudio pueden ser causantes de otras infecciones, como

En este estudio también se analizó un grupo de individuos clínicamente sanos (n=100) que fueron estrictamente seleccionados bajo la revisión y supervisión de una especialista en Endoperiodontología, en donde *S. aureus* fue identificado en el 10% de los sujetos (n=10) (Tabla 9). Los porcentajes de resistencia a los antibióticos (Tabla 11) y la frecuencia de detección y expresión de los genes de

virulencia de las cepas de *S. aureus* (Tabla 14) de los sujetos sanos fue muy semejante al encontrado en las cepas de los pacientes con enfermedad periodontal, lo que podría ser un factor de riesgo a futuro para coadyuvar en las infecciones periodontales.

8. CONCLUSIONES

- En este estudio se identificó a *Staphylococcus aureus* asociado con mayor frecuencia a los pacientes con periodontitis moderada.
- Se encontró que todas las cepas de MRSA aisladas de la enfermedad periodontal fueron resistentes a múltiples antibióticos, principalmente a los β -lactámicos (ampicilina, dicloxacilina, cefotaxima, penicilina y cefalotina), aminoglucósidos (gentamicina), y macrólidos (eritromicina), en un rango de seis a doce.
- Los genes de virulencia detectados y expresados con mayor frecuencia en las cepas de *S. aureus* fueron *spa*, *coa*, *clfB*, *ebps*, *sdrC* y *sdrD*. La detección y expresión de estos marcadores fue evidente entre las cepas de *S. aureus* aisladas de los pacientes con periodontitis moderada.
- Aunque *S. aureus* no se ha considerado un agente etiológico de periodontitis, estas cepas presentes en los sacos periodontales podrían contribuir con genes de virulencia o de resistencia a los antibióticos mediante transferencia genética horizontal ya que la mayoría de las cepas fueron formadoras de biopelícula, favoreciendo dicha transferencia de genes, además de que la formación de biopelícula aumenta la agudeza y propagación de la infección.

- En este estudio se identificaron 13 tipos de *spa* en las cepas aisladas de enfermedad periodontal siendo el de mayor frecuencia t91. El tipo de *spa* identificado en las cepas del grupo control fue sólo el t539. Ninguno de estos tipos de *spa* están reportados para México.
- Este es el primer estudio realizado en México sobre marcadores de virulencia y resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus* Metilina Resistentes (MRSA) aislados de enfermedades periodontales.

9. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la presencia de *S. aureus* antes y después de modificar la dieta de los pacientes diagnosticados con periodontitis.

2. Aislamiento de bacteriófagos de las cepas de *S. aureus*:
 - a) Clasificación
 - b) Identificación de transductores
 - c) Búsqueda de fagos convertidores *h1b* (conversión lisogénica)

3. Estudio de la degradación del rojo congo por cepas clínicas.

4. Secuenciación de genomas completos de las cepas aisladas de periodontitis.

5. Inhibición del QS por autoinductores.

10. ANEXO 1

10.1 Fotografías de los genes amplificados por PCR convencional

10.1.1 Adhesinas

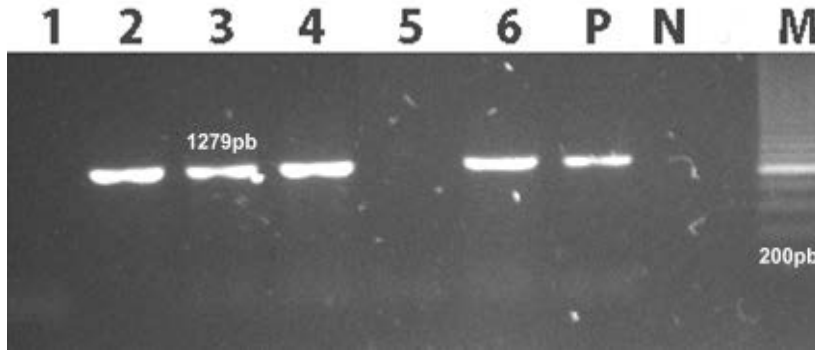


Figura 24. Detección del gen *fnbA* (1279 pb) por PCR. Carriles 2, 3 gen *fnbA* en cepa de *S. aureus* del grupo control; carril 4 y 6 gen *fnbA* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (200 pb) P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

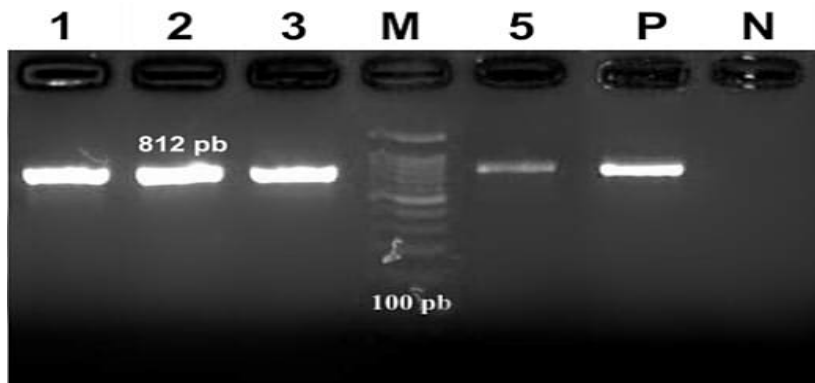


Figura 25. Detección del gen *fnbB* (812 pb) por PCR. Carril 1 gen *fnbB* en cepas de *S. aureus* del grupo control; carril 2, 3 y 5 gen *fnbB* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

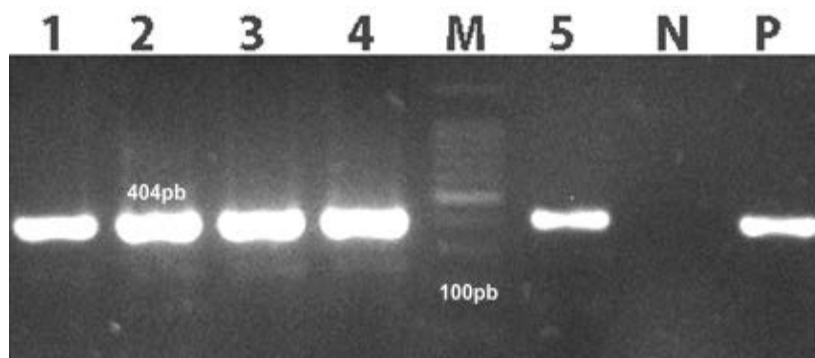


Figura 26. Detección del gen *clfA* (polimorfo) por PCR. Carriles 1, 2 *gen clfA* en cepas de *S. aureus* del grupo control; carriles 3, 4 y 5 *gen clfA* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

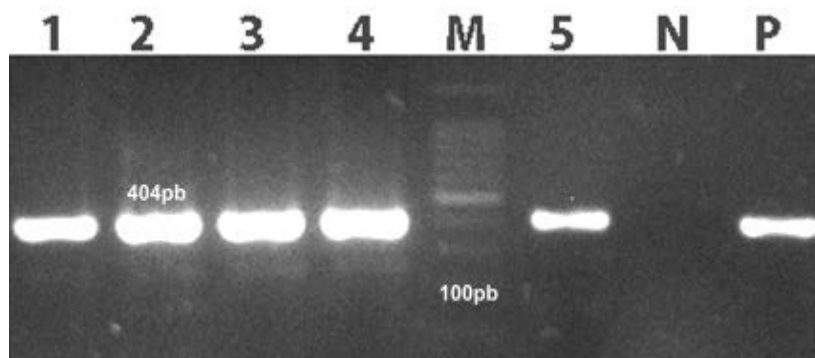


Figura 27. Detección del gen *clfB* (404 pb) por PCR. Carriles 1, 2 *gen clfB* en cepa de *S. aureus* del grupo control; carriles 3, 4 y 5 *gen clfB* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

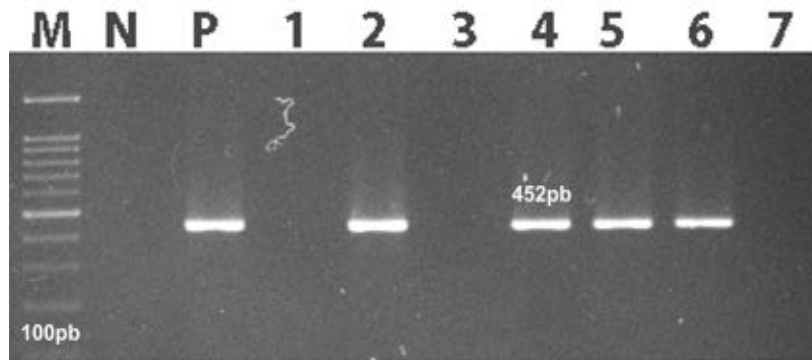


Figura 28. Detección del gen *cna* (452 pb) por PCR. Carriles 2, 4 gen *cna* en cepa de *S. aureus* del grupo control, 5 y 6 gen *cna* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

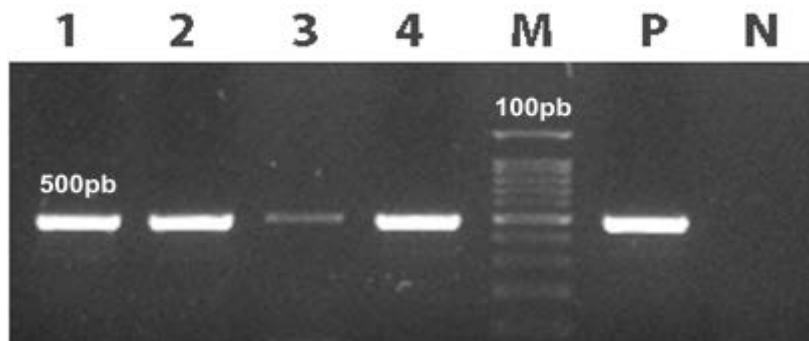


Figura 29. Detección del gen *bbp* (500 pb) por PCR. Carriles 1, 2, 3 y 4 gen *bbp* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

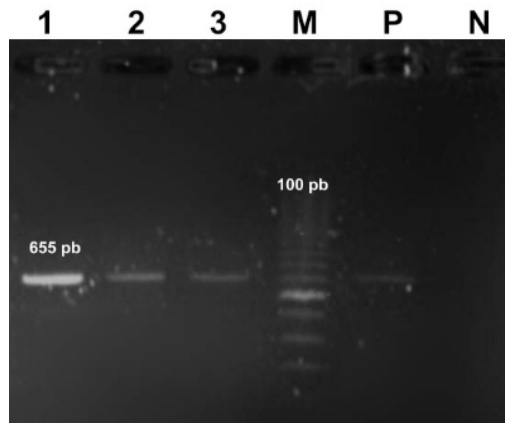


Figura 30. Detección del gen *map-eap* (655 pb) por PCR. Carril 1 gen *map-eap* en cepa de *S. aureus* del grupo control; carril 2 y 3 gen *map-eap* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

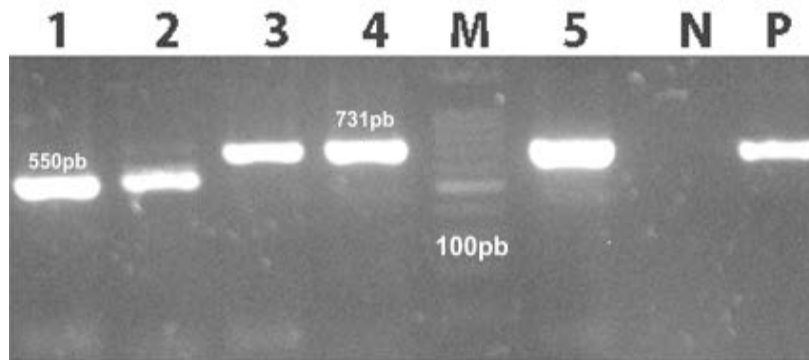


Figura 31. Detección de los genes *ebpS* (550 pb) y *sdrC* (731pb) por PCR. Carril 1 gen *ebpS* cepa de *S. aureus* del grupo control; carril 2 gen *ebpS* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; carril 3 gen *sdrC* en cepas de *S. aureus* del grupo control; 4 y 5 gen *sdrC* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

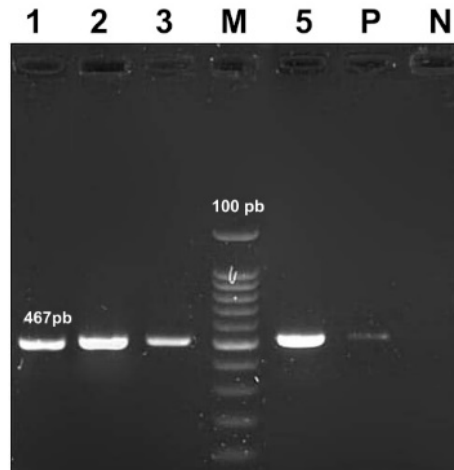


Figura 32. Detección del gen *sdrD* (467 pb) por PCR. Carriles 1, 2, gen *sdrD* cepas de *S. aureus* del grupo control; carril 3 y 5 en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

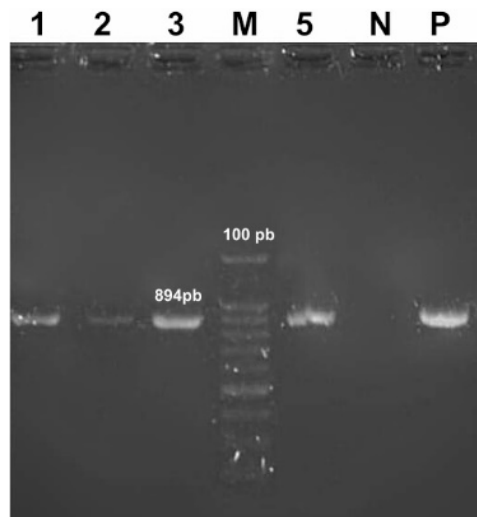


Figura 33. Detección del gen *sdrE* (894 pb) por PCR. Carriles 1, 2, gen *sdrE* cepas de *S. aureus* del grupo control; carril 3 y 5 gen *sdrE* en cepa de *S. aureus* de paciente con lesión periodontal; M marcador de peso molecular (100 pb); P: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592) y N: control negativo (sin DNA molde).

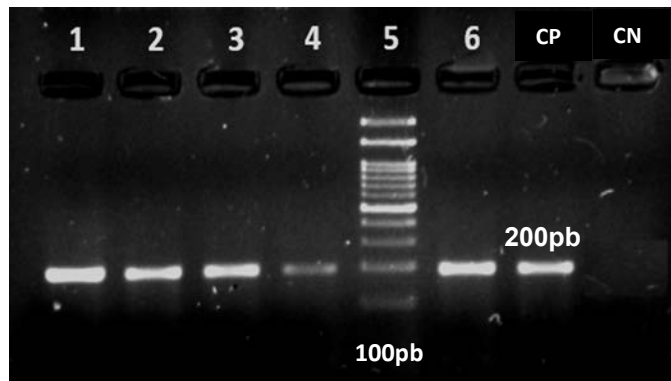


Figura 34. Detección del gen *spa* (200 pb) por PCR. Carriles 1,2 y 3 *spa* en cepas de *S. aureus* de pacientes con lesión periodontal; carriles 4 y 6 *spa* en cepas de *S. aureus* del grupo control; carril 5 marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*S. aureus* ATCC 33592); control negativo (sin DNA molde).

11. ANEXO 2

11.1 Gráficas de PCR en tiempo real y curva de disociación (expresión de los marcadores de virulencia)

11.1.1 23S rRNA

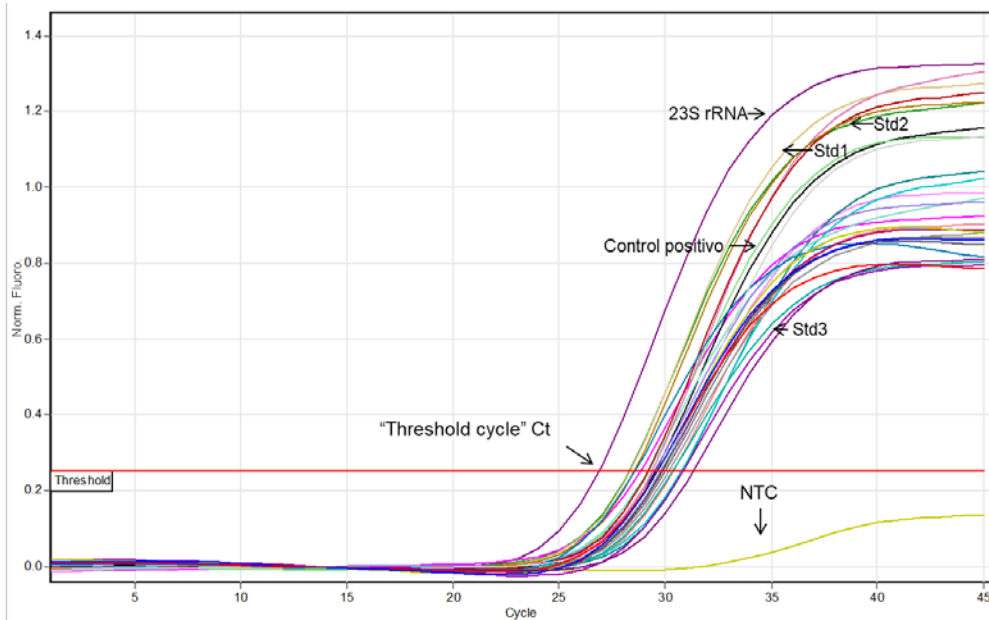


Figura 35. Expresión del gen *23S rRNA* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *23S rRNA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

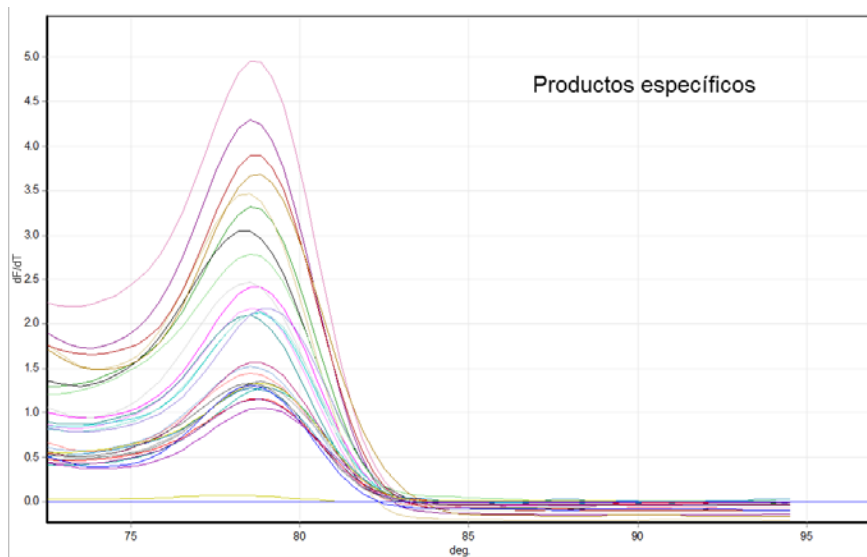


Figura 35 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *RNAr 23S*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

11.1.2 *coa*

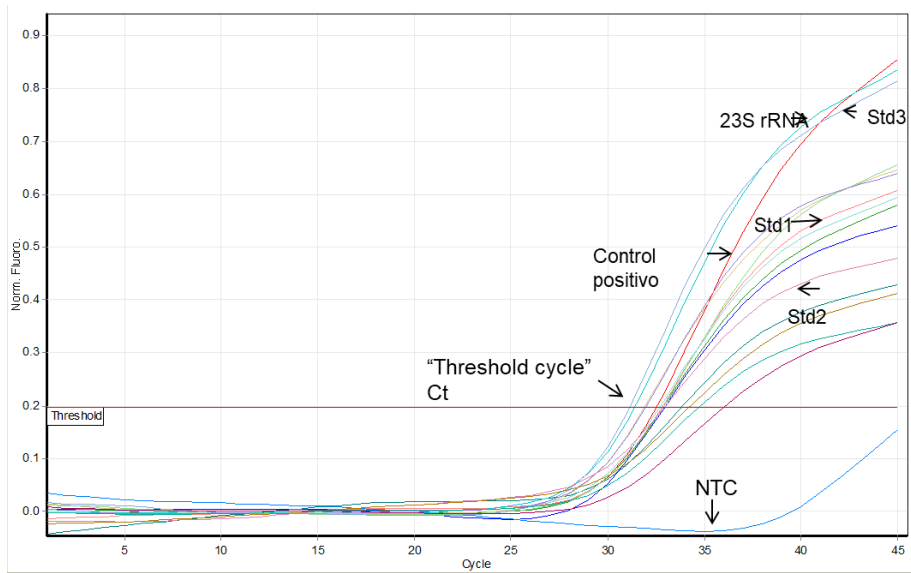


Figura 36. Expresión del gen *coa* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *coa*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: 23S *rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde)

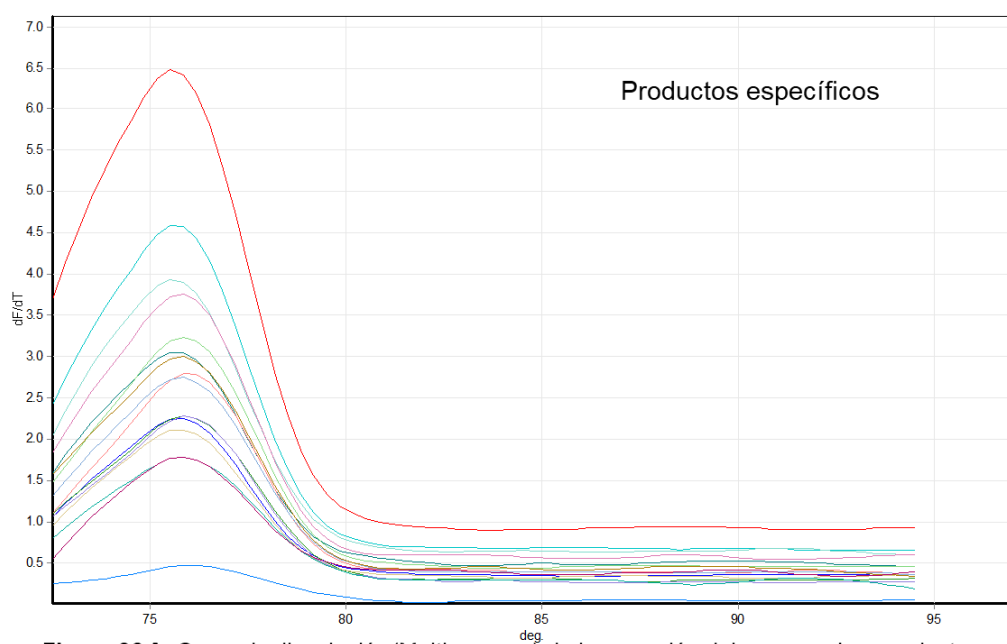


Figura 36 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *coa*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

11.1.3 *icaAB*

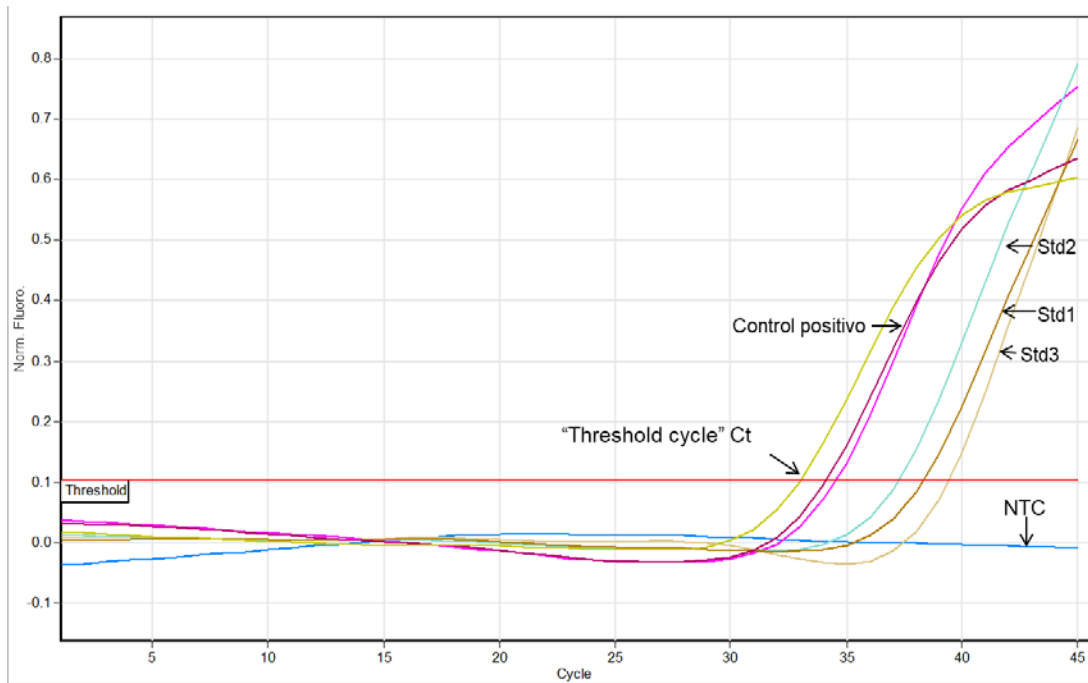


Figura 37. Expresión del gen *icaAB* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *icaAB*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

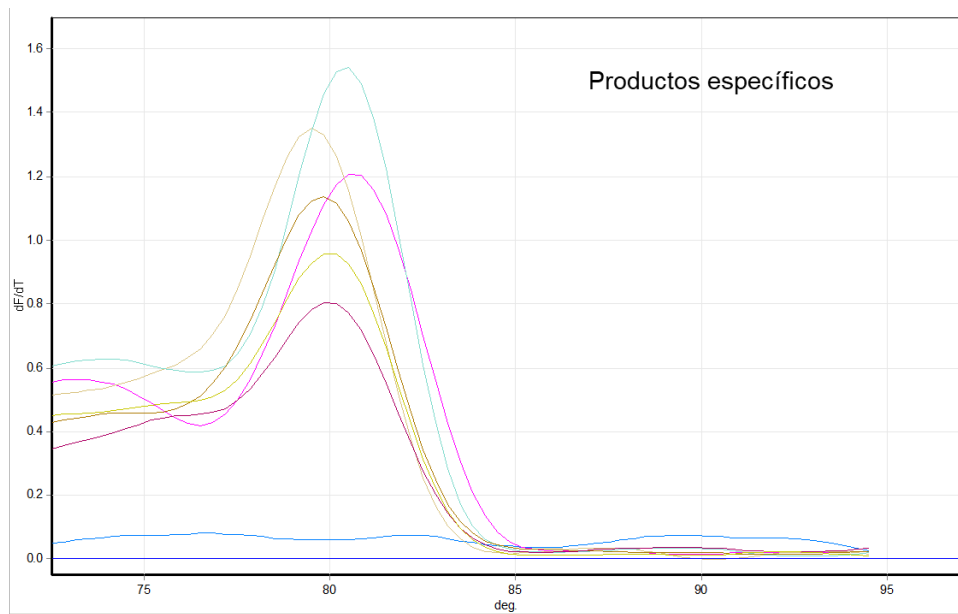


Figura 37 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *icaAB*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

11.1.4 Adhesinas

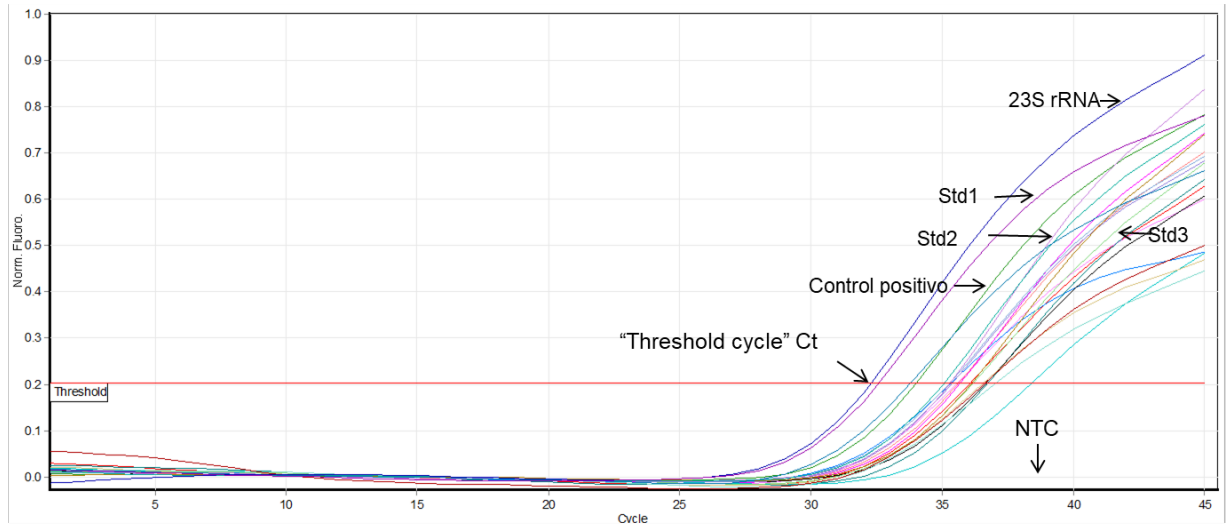


Figura 38. Expresión del gen *cfaA* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *cfaA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: 23S *rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

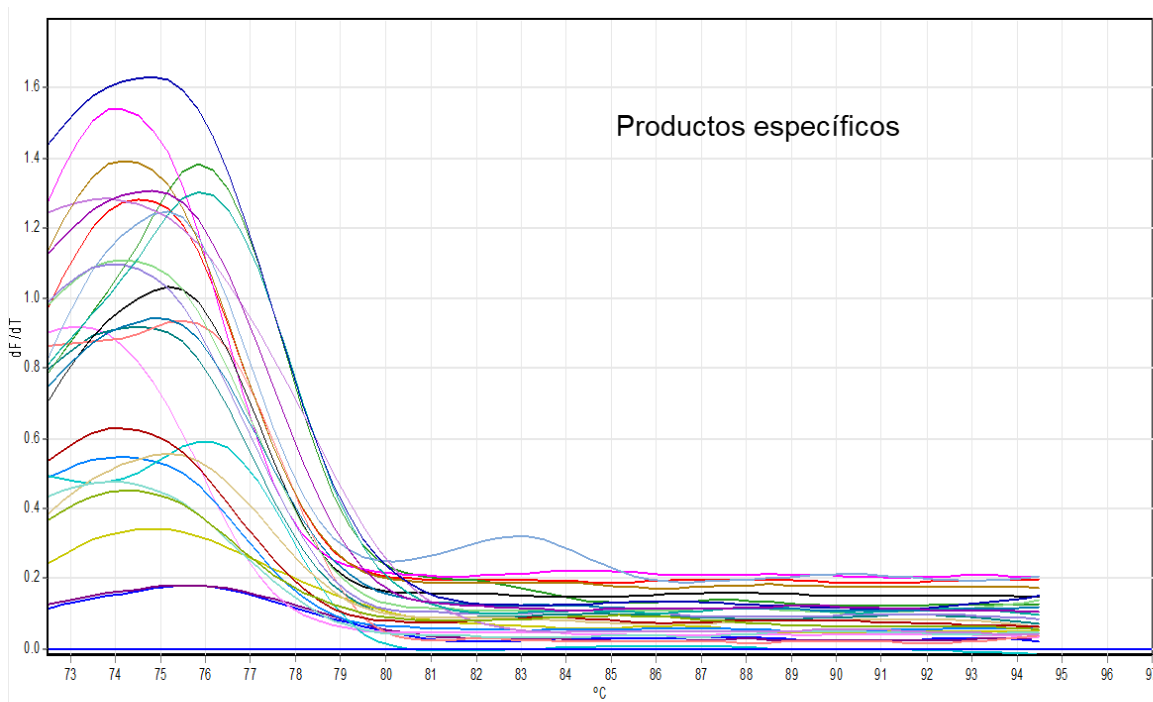


Figura 38 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *cfaA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

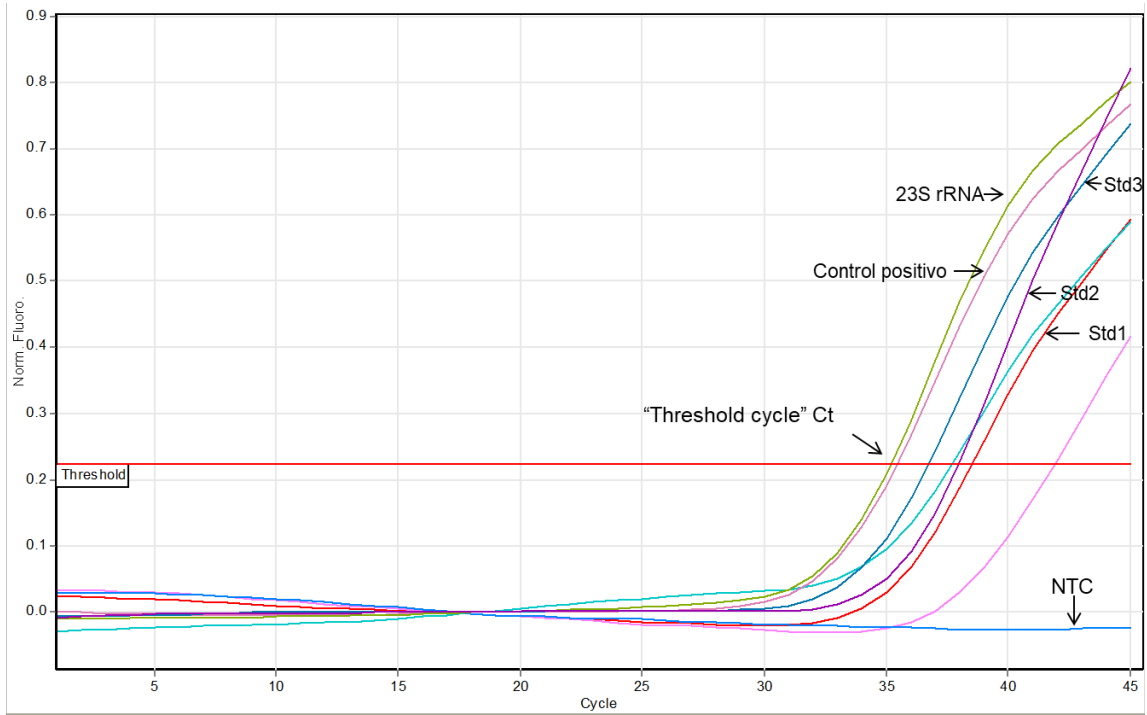


Figura 39. Expresión del gen *clfB* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *clfB*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: 23S *rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

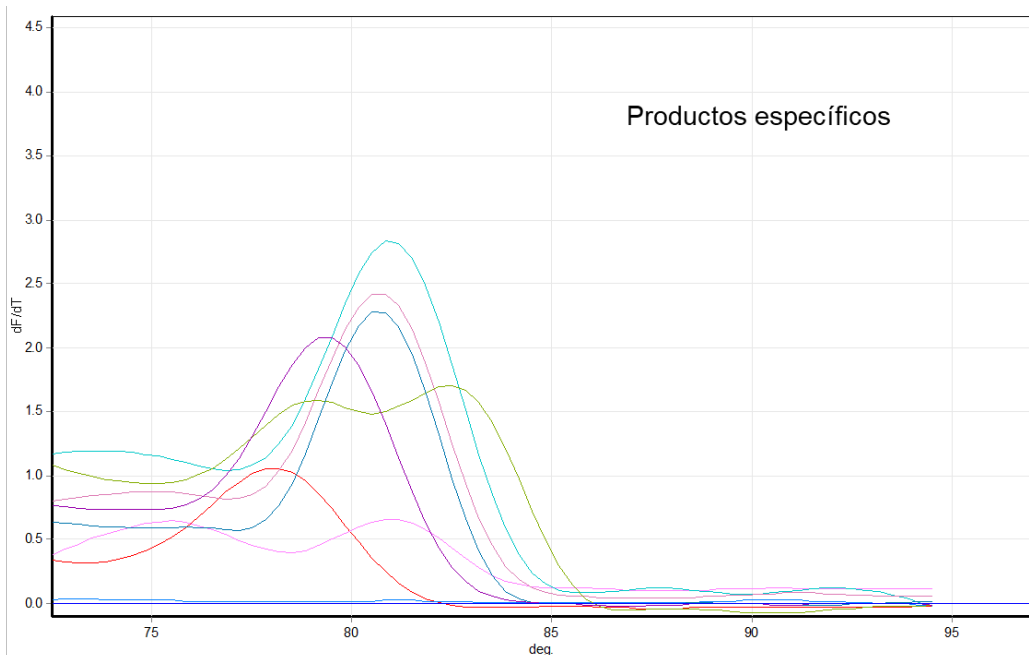


Figura 39 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *clfB*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

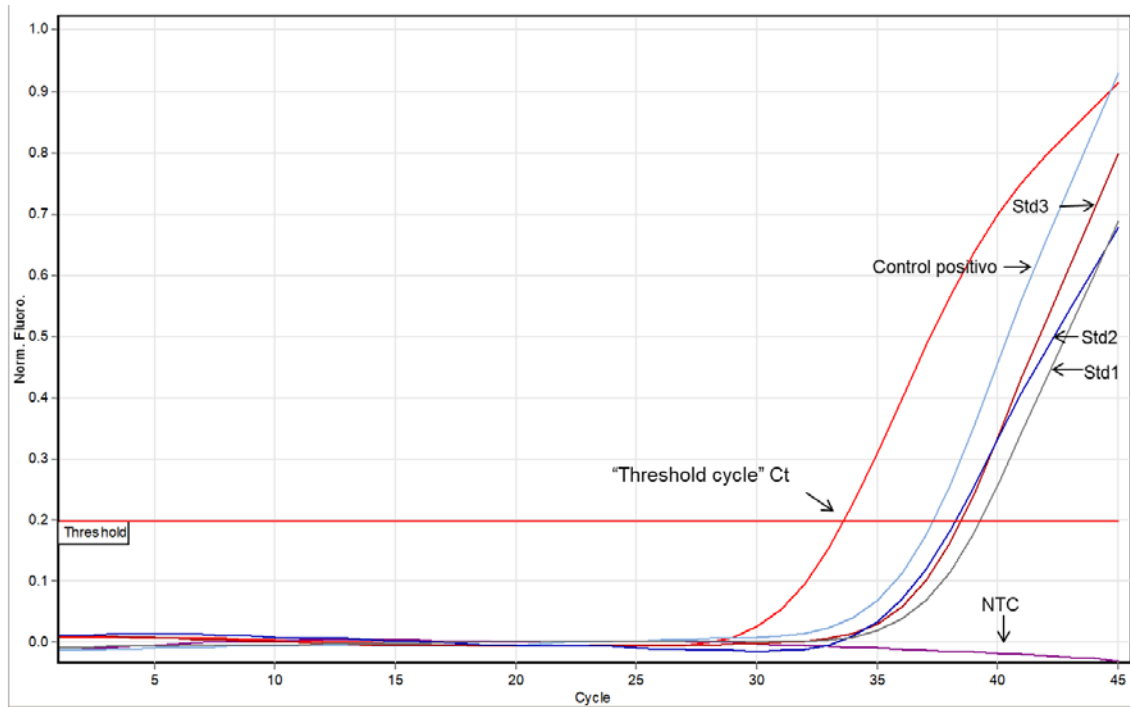


Figura 40. Expresión del gen *fnbA* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *fnbA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

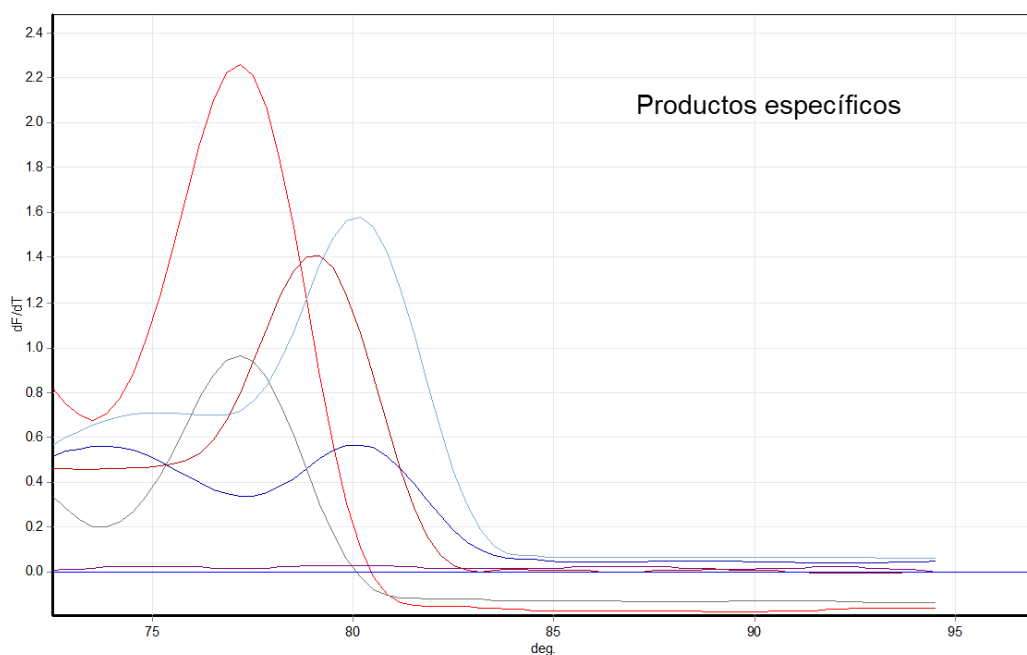


Figura 40 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *fnbA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

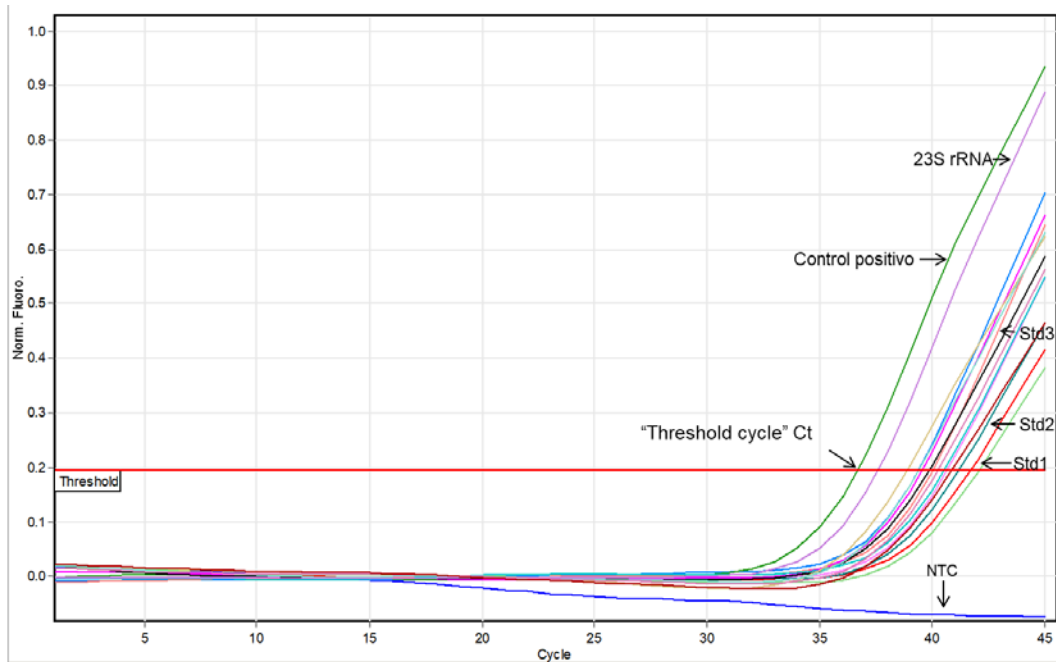


Figura 41. Expresión del gen *fnbB* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *fnbB*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

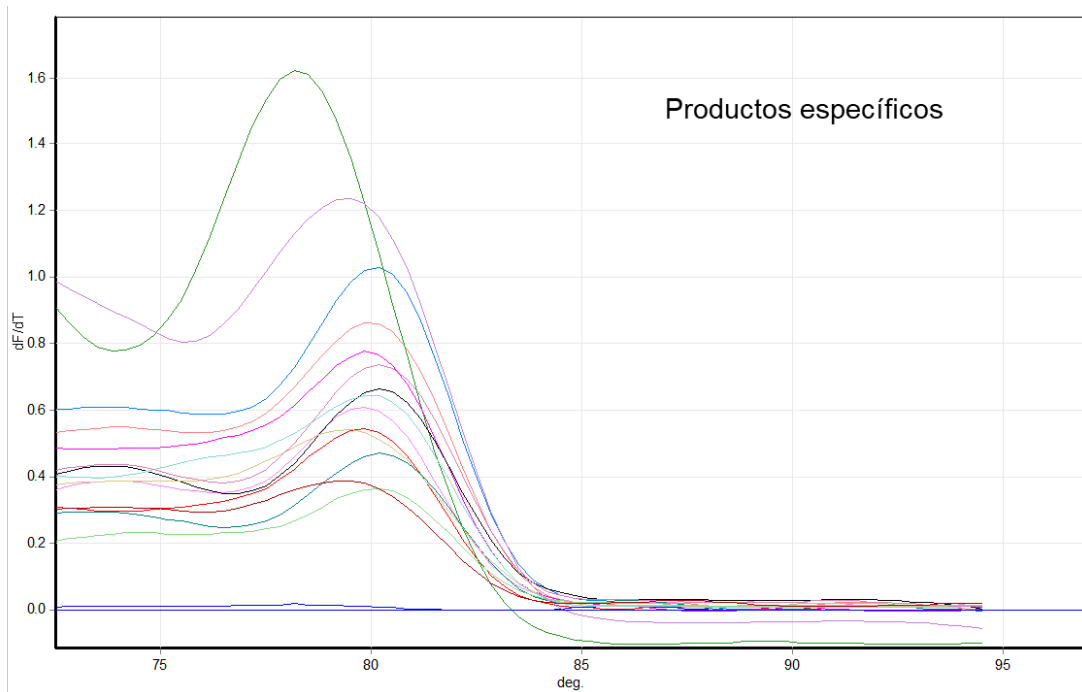


Figura 41 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *fnbB*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

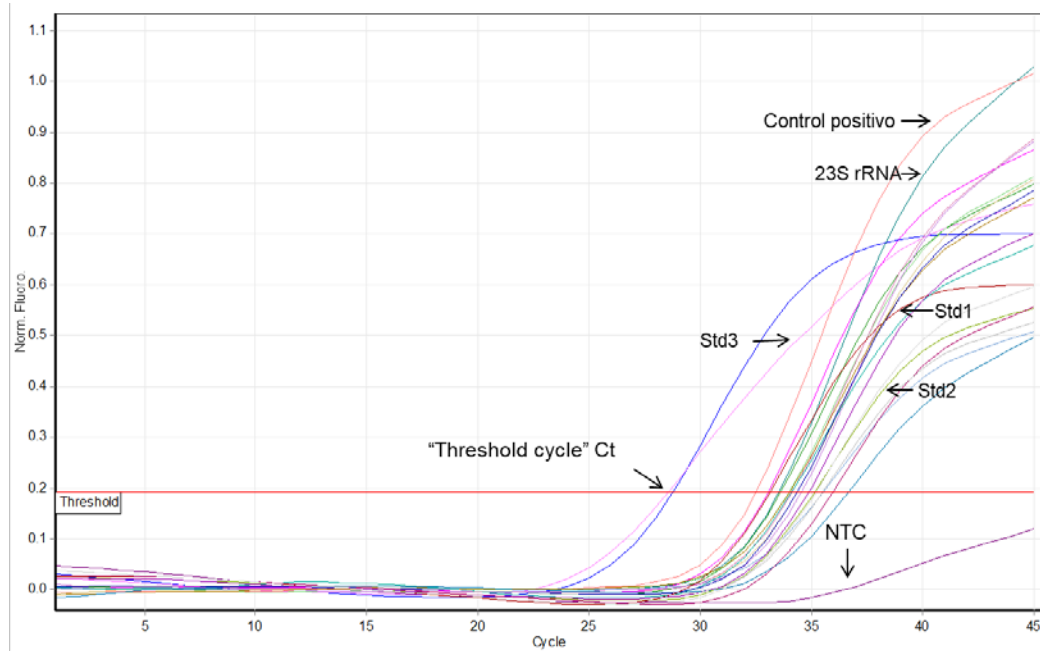


Figura 42. Expresión del gen *cna* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *cna*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: 23S *rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

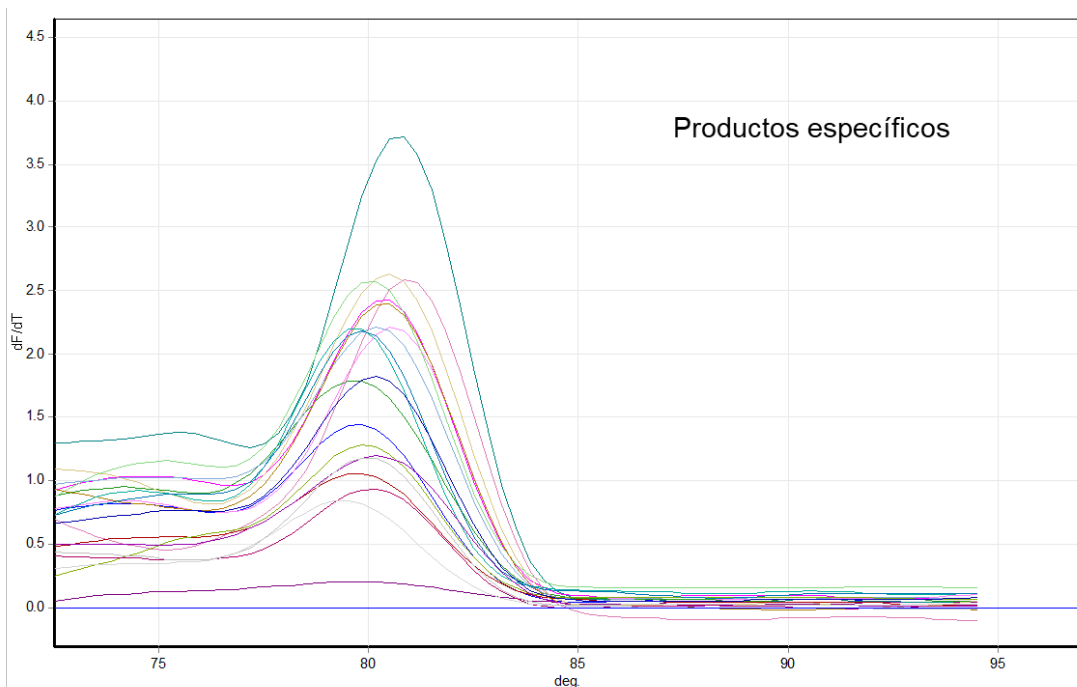


Figura 42 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *cna*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

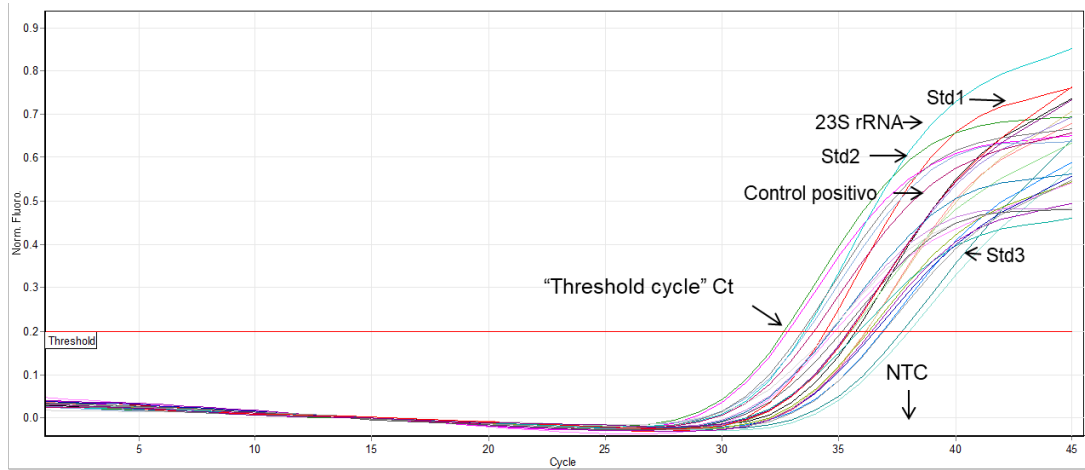


Figura 43. Expresión del gen *map-eap* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *map-eap*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

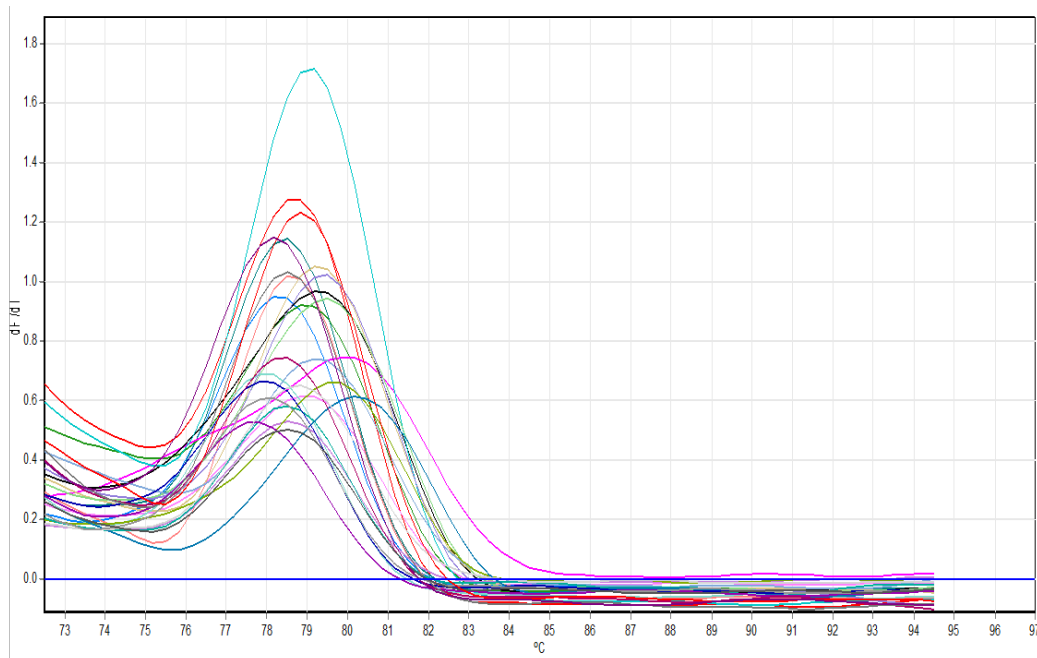


Figura 43 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *map-eap*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

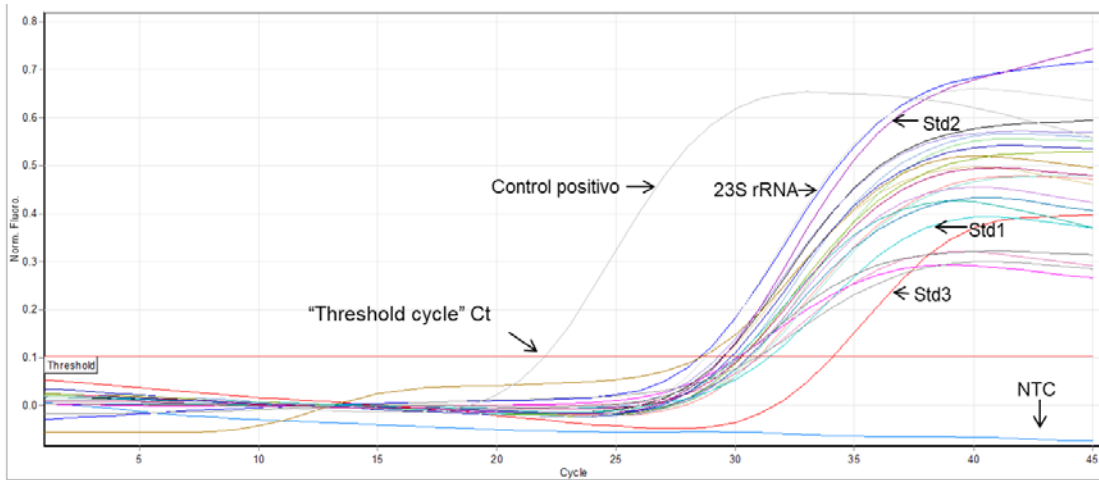


Figura 44. Expresión del gen *bbp* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *bbp*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

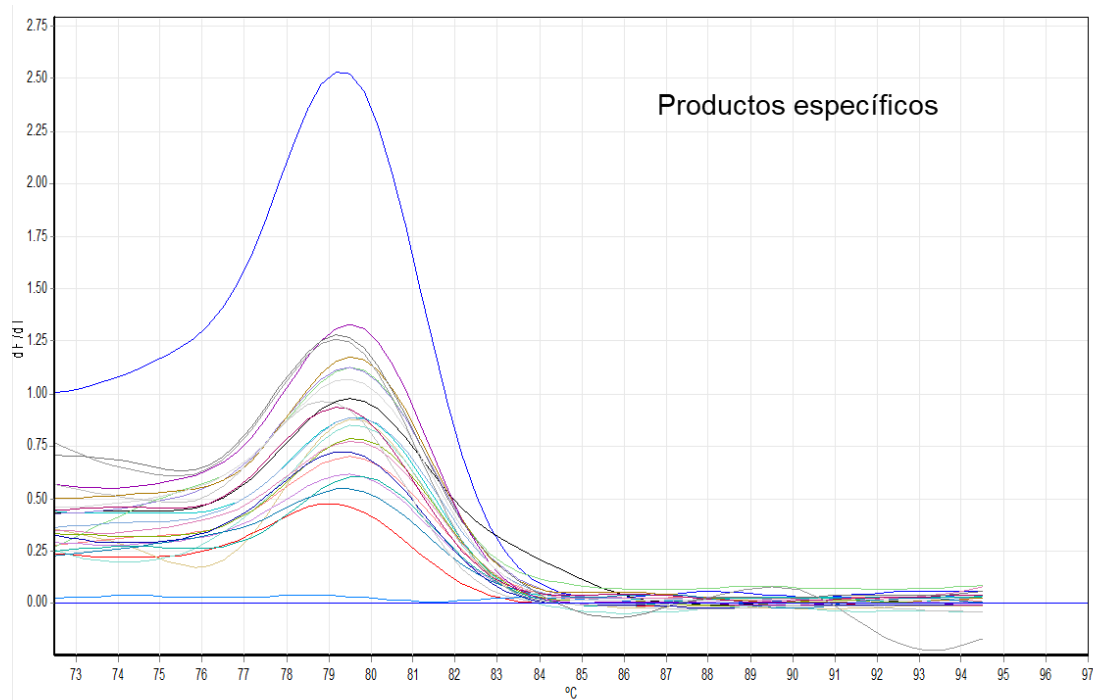


Figura 44 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *bbp*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

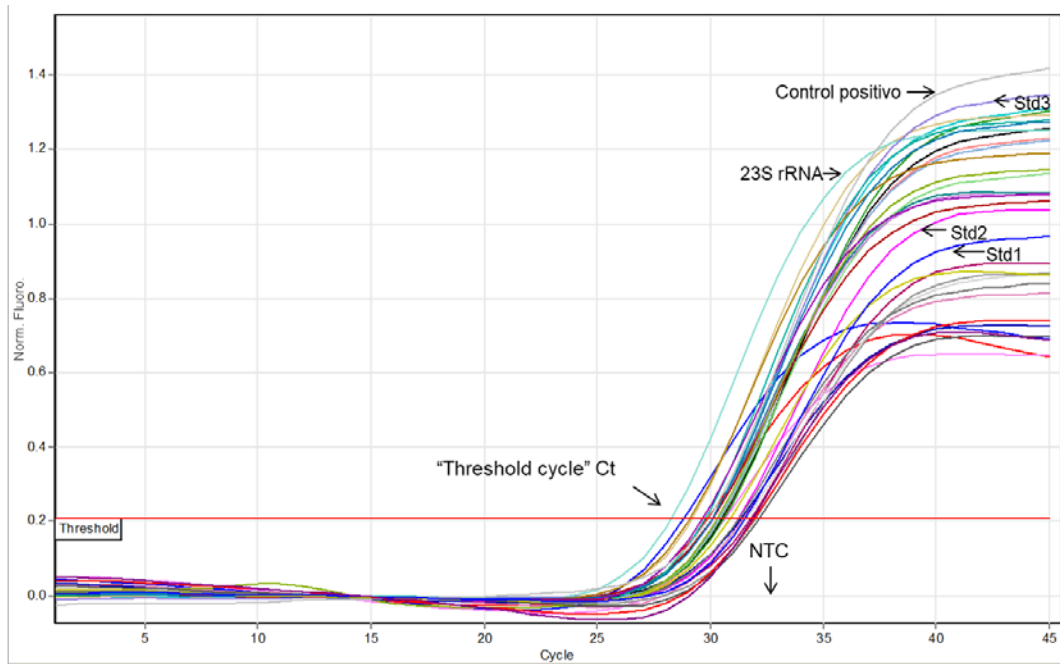


Figura 45. Expresión del gen *ebpS* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *ebpS*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: 23S *rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

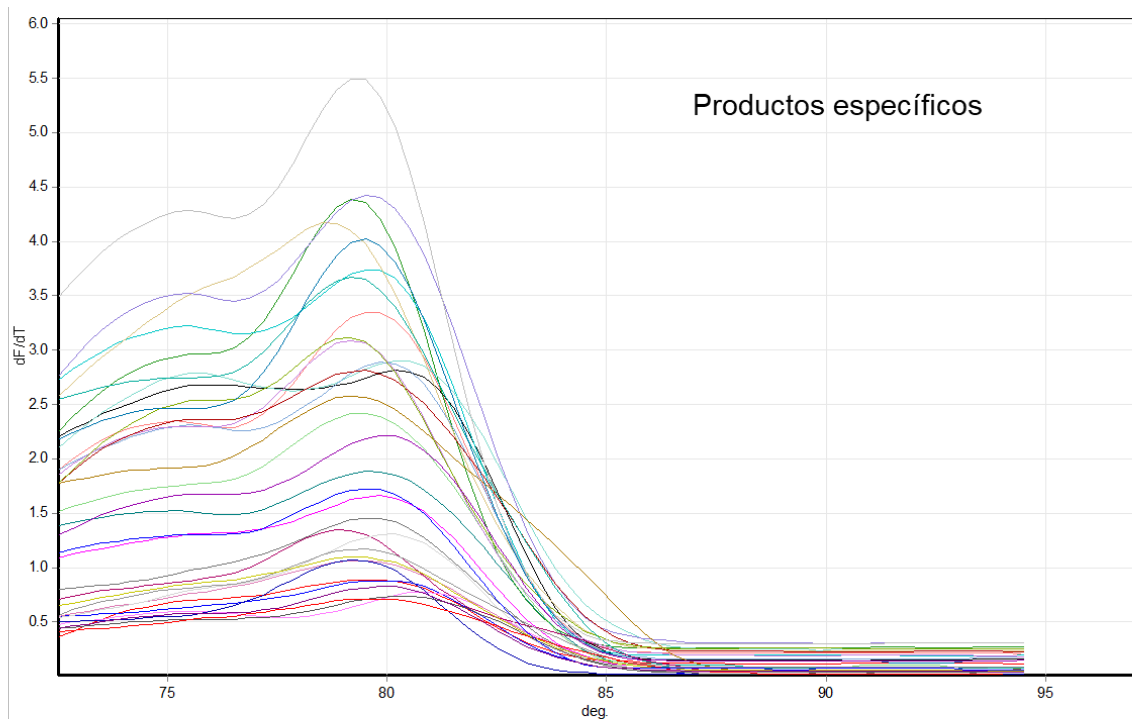


Figura 45 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *ebpS*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

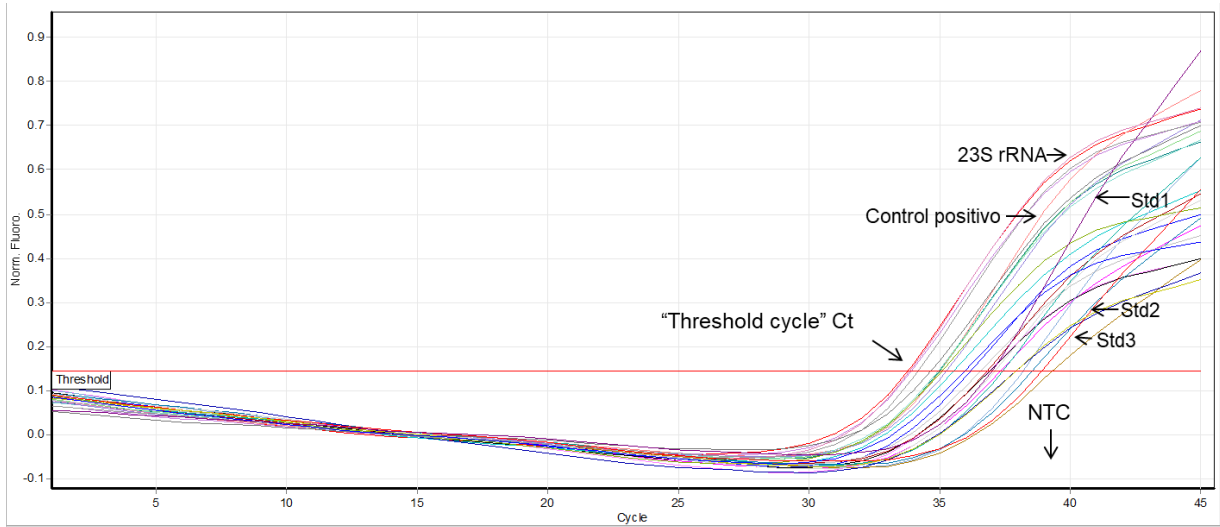


Figura 46. Expresión del gen *sdrC* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *sdrC*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

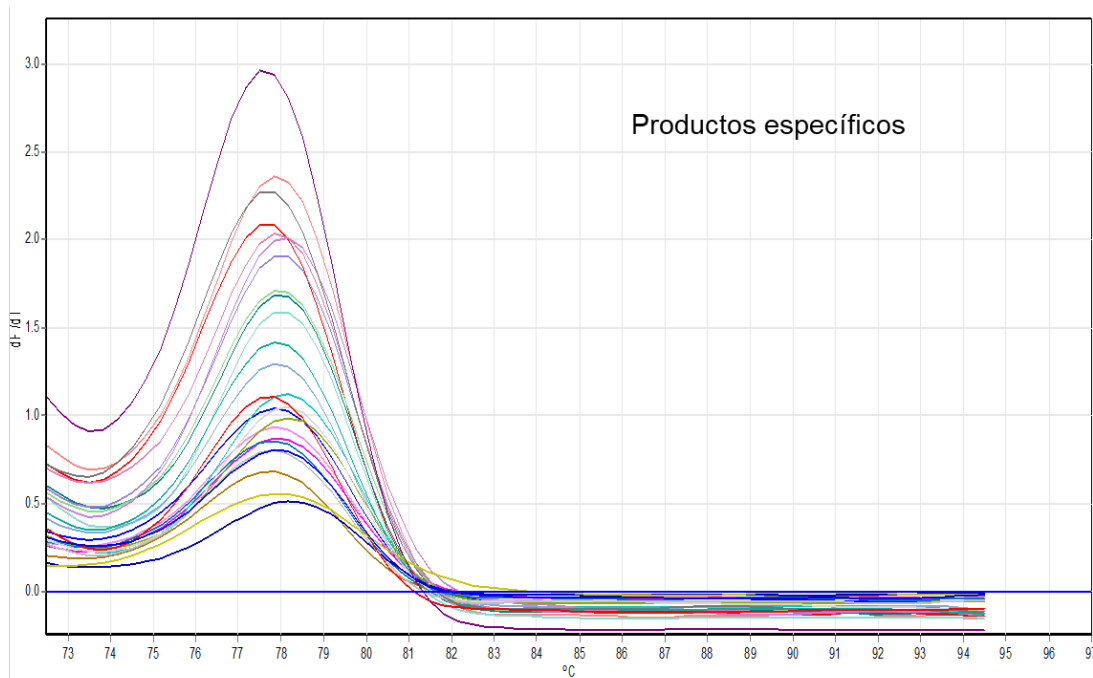


Figura 46 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *sdrC*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

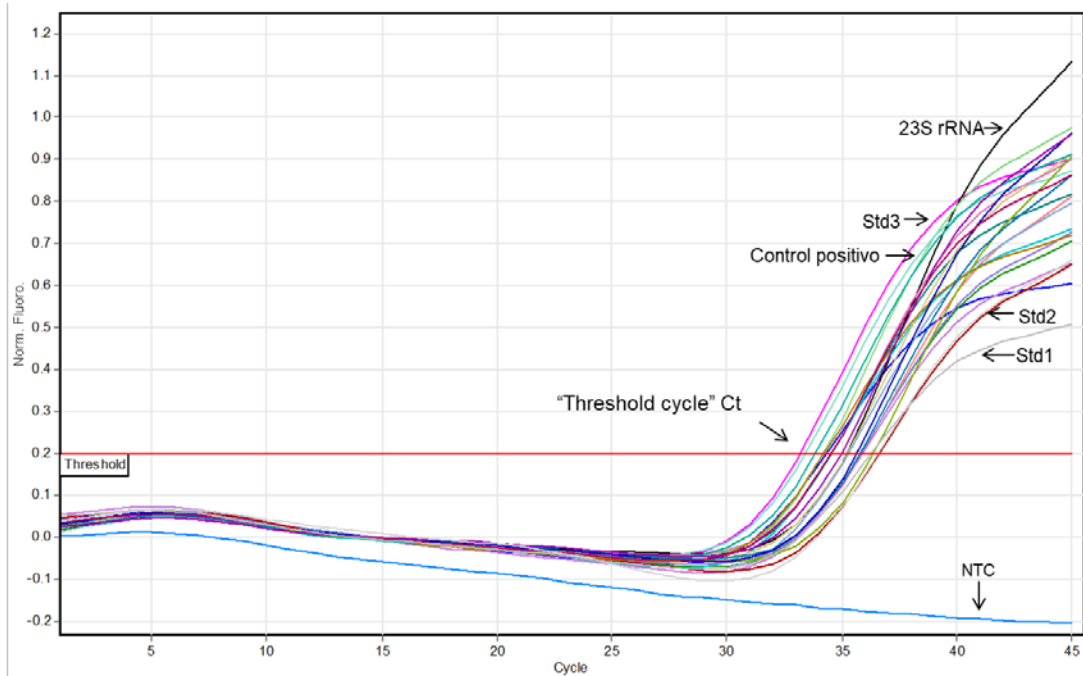


Figura 47. Expresión del gen *sdrD* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *sdrD*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: 23S *rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

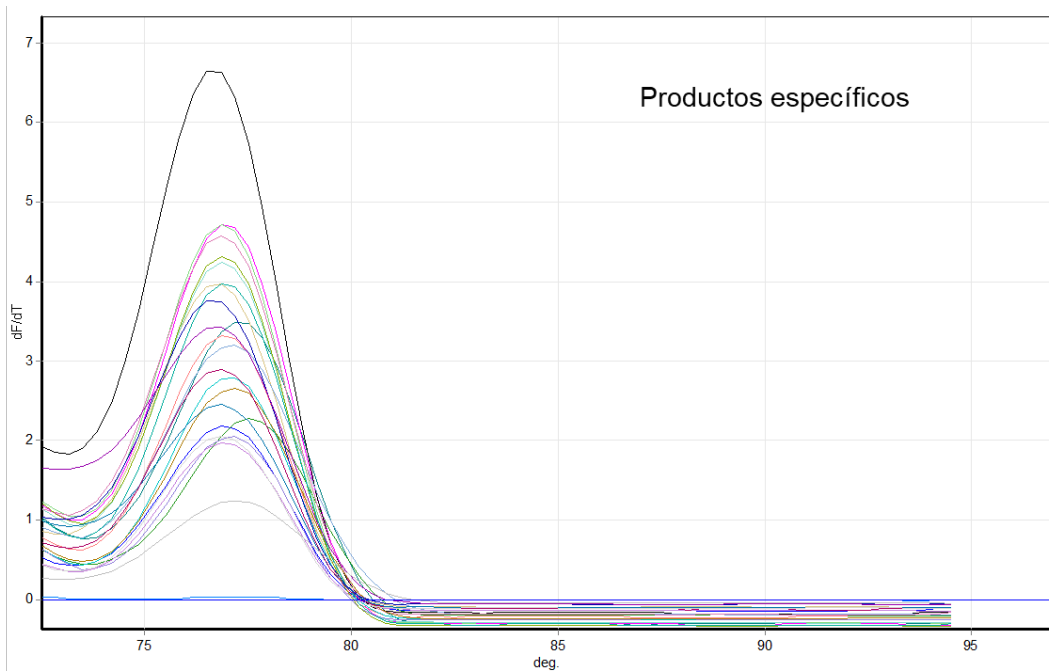


Figura 47 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *sdrD*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

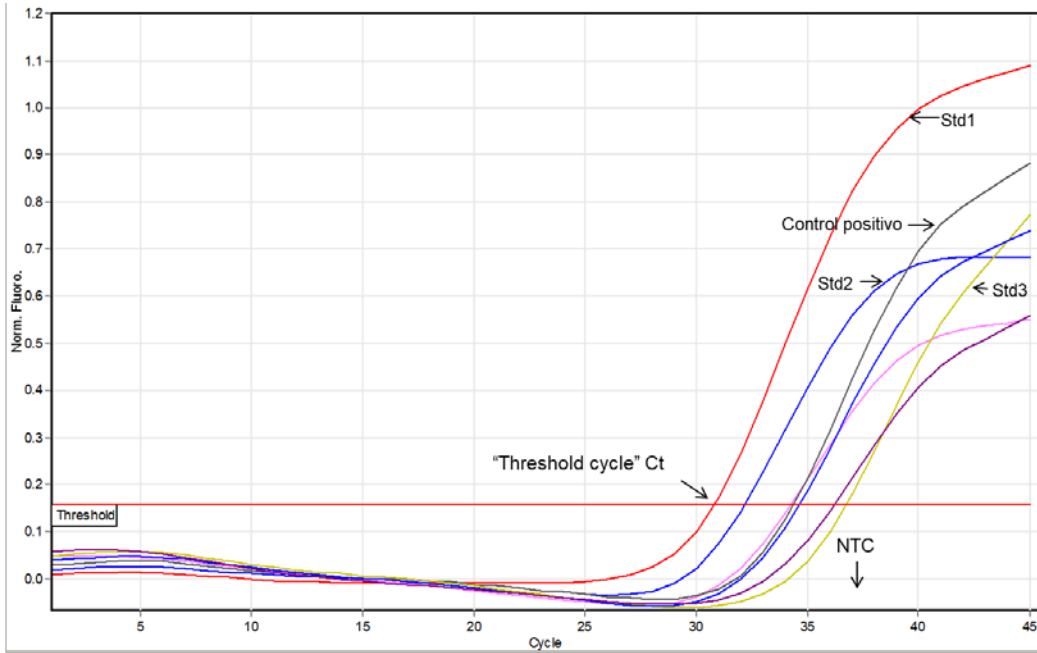


Figura 48. Expresión del gen *sdrE* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *sdrE*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: *23S rRNA*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

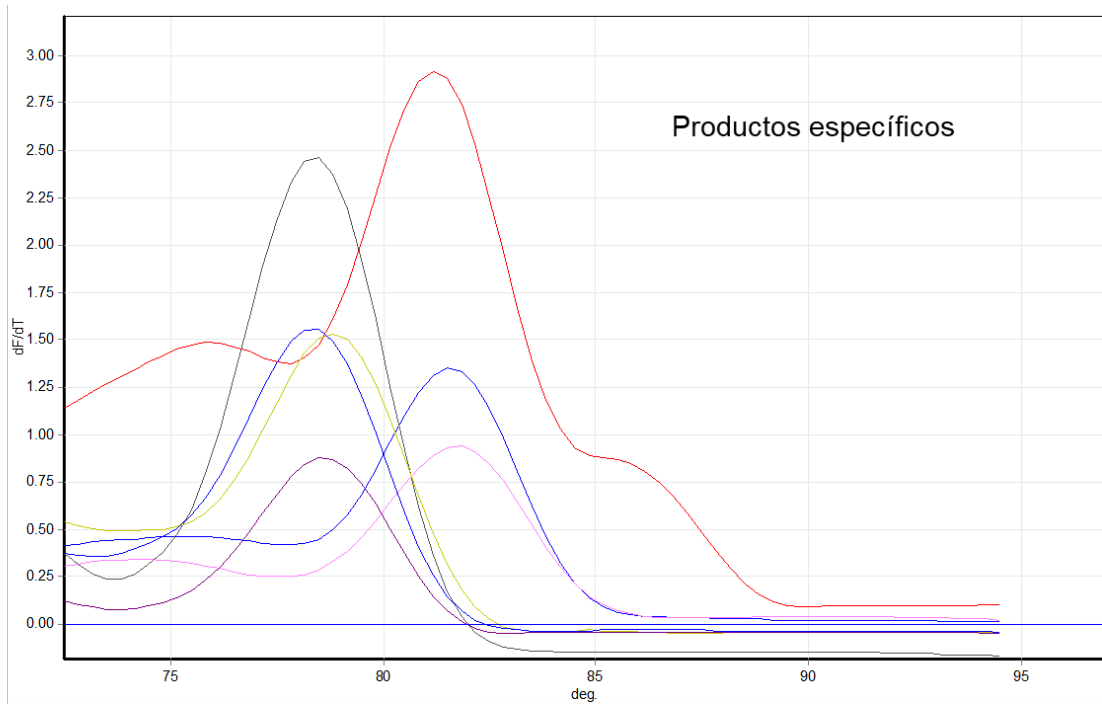


Figura 48 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *sdrE*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

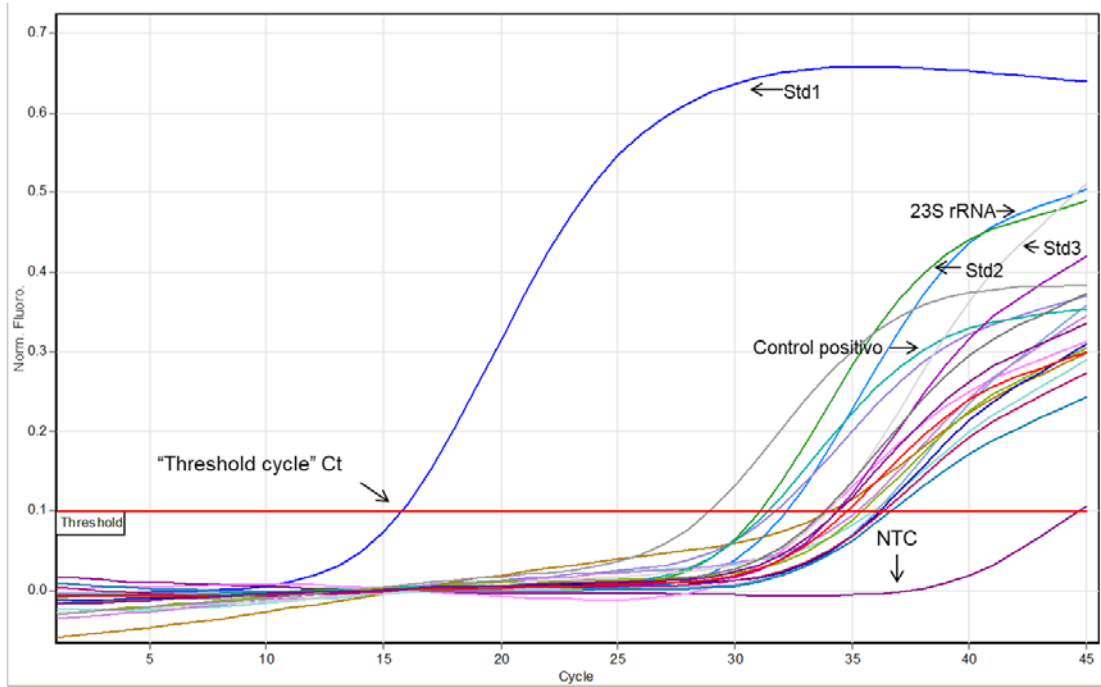


Figura 49. Expresión del gen *spa X* en las cepas de *S. aureus*. La lectura se hizo en el canal verde. Control positivo: *S. aureus* portadora del gen *spa X*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (diluciones 1:2) de DNA de *S. aureus* portadora de este gen. Gen constitutivo: 23S rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

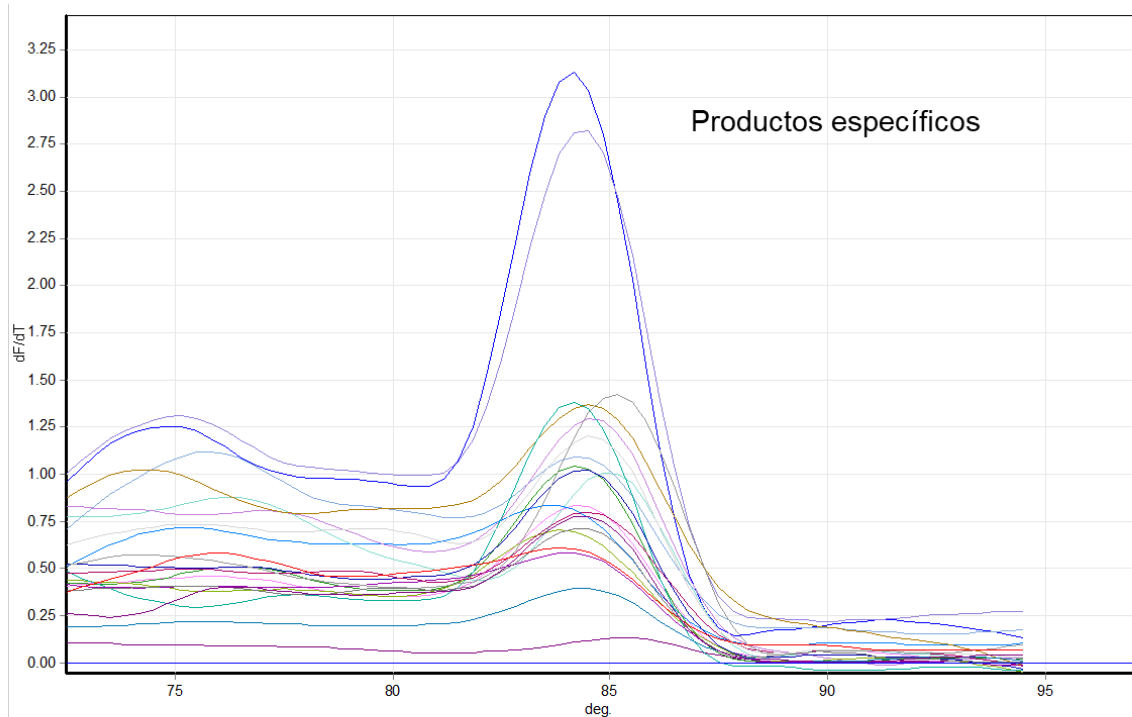


Figura 49 A. Curva de disociación (Melting curve) de la expresión del gen *spa región X*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

12. LITERATURA CITADA

1. Aggour R. L. y Gamil L. (2017) Antimicrobial Effects of Platelet-rich Plasma against Selected Oral and Periodontal Pathogens. *Pol J Microbiol.* 66(1): 31–37.
2. Amano A., Takeuchi H. y Furuta N. (2010a). Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host parasite interaction. *Microbes Infect.* 12(11): 791-798.
3. Amano A., Takeuchi H. y Furuta N. (2010b). Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. *Periodontol 2000.* 52(1): 84-93.
4. American Academy of Periodontology. (2019). Gum Disease and Men. (www.perio.org/consumer/gum-disease-and-men)
5. Betancourt M., Arce R., Botero J., Jaramillo A., Cruz C., Contreras A. (2006) Microorganismos inusuales en surcos y bolsas periodontales. *Colomb Med.* 37(1): 6-14.
6. Boles B. R. y Horswill A. R. (2008). agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 4(4): e1000052.
7. Buonavoglia A, Latronico F, Greco M. F., D'Abramo M, Marinaro M, Mangini F, Corrente M. (2010) Methicillin-resistant staphylococci carriage in the oral cavity: a study conducted in Bari (Italy) *Oral Dis.* 16(5):465-8.
8. Bustos-Martínez J. A., Hamdan-Partida A. y Gutiérrez-Cárdenas M. (2006) *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed.* 17:287-305.

9. Byrne S. J., Dashper S. G., Darby I. B., Adams G. G., Hoffmann B., Reynolds E. C. (2009). Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 24(6): 469-477.
10. Campell S. J., Deshmukh H. S., Nelson C. L., Bae I. G., Stryjewski M. E., Federspiel J. J., Tonthat J. T., Rude TH, Barriere S. L., Corey R. y Fowler V. G. Jr. (2008). Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol.* 46: 678-684.
11. Centers for Diseases Control, (2007). "Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections among Dialysis Patients—United States, 2005," *MMWR.* 56(9): 197-199.
12. Chi B., Limberger R. J. y Kuramitsu H. K. (2002). Complementation of a *Treponema denticola* flgE Mutant with a Novel Coumermycin A1-Resistant *T. denticola* Shuttle Vector System. *Infect Immun.* 70 (4): 2233–2237.
13. Chopra I. y Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol,* 65: 232–260.
14. Clarke, R. S. y Foster, J. S. (2006). Surface Adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol.* 51: 187-224.
15. Colombo A. V., Barbosa G. M., Higashi D., di Micheli G., Rodrigues P. H. y Simionato M. R. (2013). Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral

- epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J Med Microbiol.* 62:192-1600.
16. Colombo A. V., da Silva C. M., Haffajee A. y Colombo A. P. (2007). Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *J Periodontal Res.* 42(3): 236-243.
 17. Cramton S.E., Gerke C., Schnell N. F., Nichols W. W., Götz F. (1999). The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun.* 67(10): 5427-5433.
 18. Cuesta A. I., Jewtuchowicz V. M., Brusca M. I., Mujica M. T., y Rosa A. C. (2011). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in oral mucosa and pockets of patients with gingivitis-periodontitis. *Acta Odontol Latinoam.* 24(1): 35-40.
 19. Deshpande R. G. y Khan M. B. (1999) Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis* A7436. *FEMS Microbiol Lett.* 176(2): 387-394.
 20. Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 8(6): 747–763.
 21. Downer R., Roche F., Park P. W., Mecham R. P. y Foster T. J. (2002) The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell-wall-associated protein. *J Biol Chem.* 277(1): 243-250.
 22. Fine D. H., Markowitz K., Furgang D., Fairlei K., Ferrandiz J., Nasri C., McKiernan M. y Gunsolley J. (2007) *Aggregatibacter*

- actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol.* 45(12): 3859-3869.
23. Foster J. T., Geoghegan J. A., Ganesh V. K. y Höök M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 12(1): 49-62.
 24. Foster T.J. y Höök M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6(12): 484-488.
 25. Fredheim E. G., Klingenberg C., Rohde H., Frankenberger S., Gaustad P., Flaegstad T., y Sollid J. E. (2009). Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 47(4): 1172-1180.
 26. Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 42(8): 872-874.
 27. Genko R. J. y Borgnakke W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 62(1): 59-94.
 28. Götz F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 43(6): 1376-1378.
 29. Goulhen F., Grenier D. y Mayrand D. (2003) Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections. *Crit Rev Oral Biol Med.* 14(6): 399-412.
 30. Goulhen F., Hafezi A., Uitto V. J., Hinode D., Nakamura R., Grenier D. y Mayrand D. (1998). Subcellular localization and cytotoxic activity of the

- GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 66(11): 5307-5313.
31. Green C.B., Cheng G., Chandra J., Mukherjee P., Ghannoum M. A. y Hoyer L. L. (2004). RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiol.* 150(2): 267-275.
 32. Grenier D. (1995). Characterization of the trypsin-like activity of *Bacteroides forsythus*. *Microbiol.* 141(4): 921-926.
 33. Haaber J., Penadés R. J. e Ingmer H. (2017). Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbio*, 25(11): 893-905.
 34. Hacker J. y Carniel E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* 2(5): 376-381.
 35. Haffajee A. D. y Socranski S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 5: 78-111.
 36. Hamlet S. M., Ganashan N., Cullinan M. P., Westerman B., Palmer J. E. y Seymour G. J. (2008). A 5-year longitudinal study of *Tannerella forsythia* prfH genotype: association with loss of attachment. *J Periodontol.* 79(1): 144-149.
 37. Han S. H, Song I. S., Kim J. K., Park J. G., Park J. H., Myeong J. L., Shin M. K., Hartman B. J, Tomasz A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 158. 513–516.

38. Henderson B., Wilson M. y Hyams J. (1998). Cellular microbiology: cycling into the millenium. *Trends Cell Biol.* 8(10): 384-387.
39. Hienz S. A., Palma M., Flock J. I. (1996). Insertional inactivation of the gene for collagen-binding protein has a pleiotropic effect on the phenotype of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 178 (17): 5327-5329.
40. Hiramatsu K., Katayama Y., Matsuo M., Sasaki T., Morimoto Y., Sekiguchi A. y Baba T. (2014). Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J Infect Chemother.* 20(10): 593-601.
41. Holt S. C. y Ebersole J. L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 38: 72-122.
42. Holt S. C., Ebersole J., Felton J., Brunsvold M. y Kornman K. S. (1988). Implantation of *Bacteroidetes gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science.* 239(4835): 55-57.
43. Holt S. C., Kesavalu L., Walker S. y Genco C. A. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* 20(1): 168-238.
44. Ito T., Okuma K., Ma X. X., Yuzawa H. y Hiramatsu K. (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat.* 6(1): 41-52.
45. Jackson M. S., Bagg J., Gupta M. N. y Sturrock R. D. (1999) Oral carriage of Staphylococci in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 38(6): 572-575.

46. Johansson A., Claesson R., Hänström L. y Kalfas S. (2003). Serum-mediated release of leukotoxin from the cell surface of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Eur J Oral Sci.* 111(3): 209-215.
47. Josee J., Laurent F. y Diot A. (2017). Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. *Front Microbiol.* 8: 2433.
48. Juhas M. (2015). Horizontal gene transfer in human pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 41(1): 101-108.
49. Kang J. K. (2010). Monitoring of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal swabs obtained from dental clinic healthcare providers and medical environment nurses. *Int J Oral Biol.* 35(1): 66-77.
50. Karunakaran, T. and Holt, S.C. (1993). Cloning of two distinct hemolysin genes from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* in *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 15(1): 37-49.
51. Kassebaun N. J., Bernabé E., Dahiya M., Bhandari B., Murray C. J. y Marcenes W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dental Res.* 93(11): 1045-1053.
52. Kasuga Y., Ishihara K. y Okuda K. (2000). Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. *Bulletin of Tokyo Dental College.* 41(3): 109-117.
53. Kato S., Kowashi Y. y Demuth D. R. (2002). Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog.* 32(1): 1-13.

54. Khairalla, A. S., Wasfi, R., & Ashour, H. M. (2017). Carriage frequency, phenotypic, and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dental health-care personnel, patients, and environment. *Sci Rep.* 7(1).
55. Kim G. Y. y Lee C. H. (2015). Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. *J Periodontal Implant Sci.* 45(6): 223-228.
56. Kim Y. (2012). Multiple antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in solated from periodontitis patients in Seoul, Korea. *Korean J Oral Maxillofac Pathol*; 36:317-322.
57. Kittichotirat W., Bumgarner R. E. y Chen C. (2016). Evolutionary divergence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dental Res.* 95(1): 94-101.
58. Kolenbrander P. E., Andersen R. N., Blehert D. S., Egland P. G., Foster J. S. y Palmer R. J. Jr. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3): 486-505.
59. Könönen E., Gursoy M., Gursoy U. K. (2019) Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *J. Clin. Med.* 8(1135): 6-12.
60. Koosha Z. R., Hosseini M. H., Aghdam M. E., Tajandareh G. S. & Fooladi A. (2014). Prevalence of exfoliative toxin A and B genes in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *J Infect Public Health.* 7:178-180.
61. Koukos G., Sakellari D., Arsenakis M., Tsalikis L., Slini T y Konstantinidis A. (2015). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Arch Oral Biol* 60(9): 1410-1415.

62. Kronströöm M., Svenson B., Hellman M. y Persson G. R. (2001). Early implant failure in patients treated with Brånemark system titanium dental implants: a retrospective study. *Int J of Oral Maxillo Implants*. 16(2): 201-207.
63. Kuboniwa M., Houser J. R., Hendickson E. L., Wang Q., Alghamdi S. A., Sakanaka A., Miller D. P., Hutcherson J. A., Wang T., Beck D. A. C., Whiteley M., Amano A., Wang H., Marcotte E. M., Hackett M. y Lamont R. J. (2017). Metabolic crosstalk regulates *Porphyromonas gingivalis* colonization and virulence during oral polymicrobial infection. *Nature Microbiol*. 2(11): 1493-1499.
64. Kurita H, Kurashina K, Honda T. (2006). Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via the surfaces of the dental operatory. *Br Dent J*; 201:297-300.
65. Lamont R.J. y Jenkinson H. F. (2010). Oral Microbiology at a Glance. *Wiley-BlackWell*. 85p.
66. Lee S. W., Sabet M., Um S. A., Yang J., Kim H. C. y Zhu W. (2016) Identification and characterization of the genes encoding a unique (S-) layer of *Tannerella forsythia*. *Gene*. 371(1): 102-111.
67. Li Y., Shibata Y., Zhang L., Kuboyama N. y Abiko Y. (2011). Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS induces mitochondria-dependet apoptosis in human placental trophoblasts. *Placenta*. 32(1): 11-19.
68. Li Y. y Zhou X. (2015). Subgingival Microbes. En: Atlas of Oral Microbiology from Healthy Microflora to Disease. *Academic Press*. 67–93 pp.

69. Lindsay J. A. (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 300(2): 98-103.
70. Lindsay J. A. (2014) *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *Int J Med Microbiol*. 304(2):103-9.
71. MacGowan, A., Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10): 622-628.
72. Madani A., Garakani K. y Mofrad M. R. K. (2017). Molecular mechanics of *Staphylococcus aureus* adhesin, CNA, and the inhibition of bacterial adhesión by stretching collagen. *PLOS ONE*, 12(6): 1-19.
73. Malachowa N. y DeLeo F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*. 67(18): 3057-3071.
74. Martín J.V., Morales M, Batista N, Villar J, Claverie F, Méndez S. (2004). Simultaneous PCR detection of ica cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *Int Microbiol*. 7:63-66.
75. Martínez-Ruíz F. J., Carrillo-Espíndola T. Y., Bustos-Martínez J., Hamdan-Partida A., Sánchez-Pérez L., Acosta-Gío A. E. (2014). Higher prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among dental students. *J Hosp Infect*. 86(3): 216-8.
76. Mayorga-Fayad I., Lafaurie G. I., Contreras A., Castillo D. M., Barón A. y del Rosario A. M. (2007). Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. *Biomed*. 27: 21-33.
77. McCormack, M. G., Smith, A. J., Akram, A. N., Jackson, M., Robertson, D., & Edwards, G. (2015). *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An

- overlooked source of carriage and infection? *Am J Infect Control*. 43(1): 35–37.
78. Messina J. A. Thaden J. T., Sharma-Kunkel B. K. y Fowler Jr. V. C.(2016) Impact of Bacterial and Human Genetic Variation on *Staphylococcus aureus* Infections. *PLoS Pathog*. 12(1): e1005330.
79. Miao, J., Chen, L., Wang, J., Wang, W., Chen, D., Li, L., Xu, Z. (2017). Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microb Pathog*. 107: 17-28.
80. Mitchell H. L., Dashper S. G., Catmul D. V., Paolini R. A., Cleal S. M., Slakeski N., Tan K. H. y Reynolds E. C. (2010) *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. *Microbiol*. 156: 774-778.
81. Mongodin, E., Bajolet, O., Cutrona, J., Bonnet, N., Dupuit, F., Puchelle, E., & de Bentzmann, S. (2002). Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infection and immunity*. 70(2): 620–630.
82. Moore W. E, Moore L. V. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 5: 66-77.
83. Nashev D., Toshkova K., Isrina S. O., Abdulwahed A. H., Christoph L. y Michael Z. (2004). Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett*. 233(1): 45-52.
84. Nelson K. E., Fleischmann R. D., DeBoy R. T., Paulsen I. T., Fouts D. E., Eisen J. A., Daugherty S. C., Dodson R. J., Durkin A. S., Gwinn M., Haft D. H., Kolonay J. F., Nelson W. C., Mason T., Tallon L., Gray J., Granger D.,

- Tettelin H., Dong H., Galvin J. L., Duncan M. J., Dewhirst F. E. y Fraser C. M. (2003). Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol.* 185(18): 5591-5601.
85. Novak E. A., Shao H., Daep C. A. y Demuth D. R. (2010). Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 78(7): 2919-2926.
86. Novick R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol.* 48(6): 1429-1429.
87. Novick R. P. y Geisinger E. (2008). Quorum-sensing in *Staphylococci*. *Annu Rev Genet.* 42: 5421-564.
88. Offenbacher S., Katz V., Ferik G., Collins J., Boyd D., Maynor G., McKaig R. y Beck J. (1996). Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol.* 67: 1103-1113.
89. Ohara-Nemoto Y., Haraga H., Kiruma S. y Nemoto T. K. (2008). Occurrence of Staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal-oral trafficking of the bacteria. *J Med Microbiol.* 57: 95-99.
90. Omuse G., Shivachi P., Kariuki S. & Revathi G. (2013). Prevalence of Panton Valentine Leukocidin in Carriage and Infective Strains of *Staphylococcus aureus* at a Referral Hospital in Kenya. *Open J Med Microbiol.* 3:5-8.
91. Otto M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol.* 17: 32-37.
92. Paharik, E. A. y Horswill, R. A. (2016). The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr.* 4(2): 1-48.

93. Palazzo I.C., Girb E., Pimentac F.C., Jorge de Carvalhod M., Marin da Silva Caninib S.R., Drehmer de A. Cruze E., da Costa Darinia A.L., (2010) Does the oral cavity represent an important reservoir for MRSA in healthcare workers? *J Hosp Infect.* 76: 264–279.
94. Palmqvist N., Josefsson E., Tarkowski A. (2004). Clumping factor A-mediated virulence during *Staphylococcus aureus* infection is retained despite fibrinogen depletion. *Microbes Infec.* 6(2): 196-201.
95. Paniagua-Contreras G. L., Monroy-Pérez E, Vaca-Paniagua F, Rodríguez-Moctezuma J. R., Negrete-Abascal E, Vaca S. (2014b) Implementation of a novel in vitro model of infection of reconstituted human epithelium for expression of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from catheter-related infections in Mexico. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 13:6.
96. Paniagua-Contreras G. L., Monroy-Pérez E. y Vaca S. (2007). PCR Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en materia fecal. *Universidad Nacional Autónoma de México FESI.* 1(1):43-70.
97. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Gutiérrez-Lucas R, Sáinz-Espuñes T, Bustos-Martínez J y Vaca S. (2014a). Genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and catheter of ambulatory hemodialysis patients in Mexico. *Folia Microbiol.* 59(4): 295-302.
98. Passariello C, Gigola P, Testarelli L, Puttini M, Schippa S, Petti S. (2017). Evaluation of microbiota associated with Herpesviruses in active sites of generalized aggressive periodontitis. *Ann Stomatol.* VIII (2): 59-70.

99. Pihlstrom B. L., Michalowicz B. S., Johnson N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*. 366:1809-20.
100. Pilka S. E., Werner J. M., Schwarz-Linek U., Pickford A. R., Meenan N. A., Campbell I. D. y Potts J. R. (2006). Structural insight into binding of *Staphylococcus aureus* to human fibronectin. *FEBS Lett*. 580(1): 273-277.
101. Piroth L., Que Y. A., Widmer E., Panchaud A. (2008). The Fibrinogen- and Fibronectin-Binding Domains of *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A Synergistically Promote Endothelial Invasion and Experimental Endocarditis. *Infect Immun*. 76(8): 3824-3831.
102. Rhem, M. N., Lech, E. M., Patti, J. M., McDevitt, D., Höök, M., Jones, D. B., & Wilhelmus, K. R. (2000). The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. *Infect Immun*, 68(6): 3776–3779.
103. Rizzotti L, Simeoni D, Cocconcelli P, Gazzola S, Dellaglio F, Torriani S. (2005) Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *J Food Prot*. 68:955–965.
104. Rokadiya S. y Malden N. J. (2008). An implant periapical lesion leading to acute osteomyelitis with isolation of *Staphylococcus aureus*. *Br Dent J*. 205(9): 489-491.
105. Runyen-Janecky L. J. (2013). Role and regulation of heme iron acquisition in Gram-negative pathogens. *Fron Cell Infect Microbiol*. 3: 55.
106. Sabet M., Lee S. W., Nauman R. K., Sims T. y Um H. S. (2003). The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiol*. 149: 3617-3627.

107. Sabouni, F., Mahmoudi, S., Bahador, A., Pourakbari, B., Sadeghi, R. H., Ashtiani, M. T. H., Mamishi, S. (2014). Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolates in an Iranian Referral Children's Hospital. *Osong Public Health Res Perspectiv.* 5(2): 96–100.
108. Sakamoto, M. *et al.* (2002). Reclasification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al.*, 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J System Evol Microbiol.* 52: 841-849.
109. Sánchez A. R., Kupp L. I., Sheridan P. J. y Sánchez D. R. (2004). Maternal chronic infection as a risk factor in preterm low birth weight infants: the link with periodontal infection. *J Int Academy Periodontol.* 6(3): 89-94.
110. Sánchez I. R. y Rubio A. M. (2010). Atención farmacéutica en la enfermedad periodontal (I). Un servicio de valor añadido. *ElSevier.* 29(3): 92-97.
111. Savage V. J., Chopra I. y O'Neil A. J. (2013). *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(4): 1968-1970.
112. Schaller M, Bein M, Korting CH, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B. (2003). The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun.* 71(6): 3227-3234.
113. Sekot G., Posch G., Messner P., Matejka M., Rausch-Fan X., O. Andrukhov y Schäffer C. (2011). Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. *J Dental Res.* 90, 109-114.

114. SeSa. *Enfermedad periodontal (2016)* www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/enfermedad-periodontal (fecha de publicación 07 de marzo).
115. Settem R. P., Honma K., Nakajima T., Phansopa C., Roy S., Stafford G. P. y Sharma A. (2012). A bacterial glycan core linked to surface (S)-layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. *Mucosal Immunol.* 6: 415-426.
116. Sharma A. (2010). Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontol 2000.* 54(1): 106-116.
117. Sharma A., Sojar H. T., Glurich I., Honman K., Kuramitsu H. K. y Genco R. J. (1998). Cloning expression and sequencing of a cell surface antigen containing leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATTC 43037. *Infect Immun.* 66(12): 5703-5710.
118. Siddiqi A., Milne T., Cullian M. P. y Seymour G. J. (2014) Analysis of *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *S. aureus* levels in edentulous mouths prior to and 6 months after placement of one-piece zirconia and titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 27(3): 288-294.
119. Sim J. H., Shin W. y Lux R. (2005). Protein-protein interactions in the chemotaxis signalling pathway of *Treponema denticola*. *Microbiol.* 151: 1801-1807.
120. Slots J. (2013). Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontol 2000.* 62(1): 7-19.
121. Smith J. L. y Bayles D. O. (2006). The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 32(4): 27-248.

122. Takahashi N., Sato T. y Yamada T. (2000). Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate- containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 182(17): 4704-4710.
123. Takeuchi Y., Umeda M., Sakamoto M., Benno Y., Huang Y. y Ishikawa I. (2001). *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 72(10): 1354-1363.
124. Tanner A. C. y Izard J. (2006). *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol 2000.* 42: 88-113.
125. Tanner A. C., Listgarten M. A., Ebersole J. L. y Strzempko M. N. (1986). *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow growing fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. *Int J Syst Bacteriol.* 36(2): 213-221.
126. Tefi. SN. Periodontitis e inflamación de las encías. Diente sano y gingivitis al final Periodontitis avanzada. Shutterstock. Disponible en: <https://www.shutterstock.com/es/image-vector/periodontitis-inflammation-gums-healthy-tooth-gingivitis-343669658>.
127. Thurnheer T., Belibasakis G. N. (2015). Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. *Virulence.* 6(3):258-264.
128. Tong S. Y., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L. y Fowler Jr. V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clin Microbiol Rev.* 2(3): 603-661.
129. Valotteau C., Prystopiuk V., Pietrocola G., Rindi S., Peterle D., De Filippis V., Foster T. J., Speziale P. y Dufrêne Y. F. (2017). Single-Cell and Single-

- Molecule Analysis Unravels the Multifunctionality of the *Staphylococcus aureus* Collagen-Binding Protein Cna. *ACS Nano*. 11(2): 2160-2170.
130. Vellappally, S., Divakar, D. D., Al Kheraif, A. A., Ramakrishnaiah, R., Alqahtani, A., Dalati, M. H. N., Harikrishna Varma, P. R. (2017). Occurrence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of patients with dental caries. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 64(3): 343–351.
 131. Walsh, J. e., Miajlovic, H., Gorkun, V. O. y Foster, J. T. (2008). Identification of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the α C-domain of human fibrinogen. *Microbiol*. 154(2): 550-558.
 132. Wertheim H. F., Melles D. C., Vos M. C., van Leeuwen W., Verbrugh H. A. y Nouwen J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 5(12): 751-762.
 133. Xu Z., Li L., Shirliff M. E., Peters B. M., Li B., Peng Y., Alam M. J. (2011). Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001-2006. *Clin Microbiol Infect*. (5):714-8.
 134. Yang H., Asikainen S., Doğan B., Sudan R. y Lai C. H. (2004). Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol*. 75(4): 592-599.
 135. Zhang X., Wu M., Zhuo W., Gu J., Zhang S., Ge J. y Yang M. (2015). Crystal structures of Bbp from *Staphylococcus aureus* reveal the ligand binding mechanism with fibrinogen α . *Protein & Cell*. 6(10): 757-766.

136. Zijngel V., van Leeuwen M. B., Degener J. E., Abbas F., Thurnheer T., Gmür R. y Harmsen H. J. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLOS One*. 5(2): e9321.

13. ANEXO 3

13.1 Artículo

ARTICLE IN PRESS
+ MODEL

Journal of Microbiology, Immunology and Infection xxx (xxxx) xxx



Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
journal homepage: www.e-jmii.com



Original Article

Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions

Alina Uribe-García^a, Gloria Luz Paniagua-Contreras^a,
Eric Monroy-Pérez^a, Jaime Bustos-Martínez^b,
Aída Hamdan-Partida^b, Javier Garzón^c, Jesica Alanís^a,
Rosalía Quezada^a, Felipe Vaca-Paniagua^{d,e,f}, Sergio Vaca^{a,*}

^a FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^b Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04960, Ciudad de México, Mexico

^c Clínica de Endoperiodontología, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^d Laboratorio Nacional en Salud, Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónicas-Degenerativas, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México México, Mexico

^e Instituto Nacional de Cancerología, CDMX 14080, Mexico

^f Unidad de Biomedicina, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Received 6 February 2019; received in revised form 9 April 2019; accepted 29 May 2019

Available online ■ ■ ■

KEYWORDS

Antibiotic-resistance;
Human;
In vitro infection
model;
Oral microbiota

Abstract *Background/purpose:* The aim of this study was to characterize the *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions of patients, to determine the expression of genes involved in cell adhesion upon their infection of human epithelial cells using an *in vitro* model, its biofilm formation, and its resistance to antibiotics.

Methods: *S. aureus* was analysed by PCR, Kirby–Bauer, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), measuring gene expression by real-time PCR after infection of human cells *in vitro*.

Results: *S. aureus* was identified in 18.6% (50/268) of the samples. All strains (n = 50) possessed the virulence genes *spa* (*Staphylococcal protein A*), *coa* (coagulase), and *icaAB* (intercellular adhesin); 96% (n = 48) possessed *clfB* (clumping factor B), and 88% (n = 44) possessed *ebps* (elastin-binding protein) and *sdrD* (serine aspartate repeat protein D). All strains were resistant to methicillin, ampicillin, dicloxacillin, cefotaxime, and penicillin, and were multidrug resistant to 6–12 antibiotics. PFGE analysis showed 37 different pulsed-field

* Corresponding author. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de Los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 54090, Estado de México, Mexico. Fax: +52 55 56231254.

E-mail address: vacasergio@gmail.com (S. Vaca).

<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.05.010>

1684-1182/Copyright © 2019, Taiwan Society of Microbiology. Published by Elsevier Taiwan LLC. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article as: Uribe-García A et al., Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.05.010>

types and most strains (60.4%) had a unique pulsed-field type. Twenty-four distinct combinations of virulence genes and antibiotic-resistant phenotypes were identified.

Conclusion: Although *S. aureus* has been considered a transient member of the oral microbiota, our results indicate a high-level expression of virulence genes and multidrug resistance in the strains isolated from periodontal lesions. These strains might complicate the successful treatment of the disease.

Copyright © 2019, Taiwan Society of Microbiology. Published by Elsevier Taiwan LLC. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Periodontitis is a chronic disease characterized by a persistent inflammatory immune response caused by a bacterial biofilm that over time leads to the loss of tooth-supporting connective tissue and the alveolar bone, and is a major cause of tooth loss in adults.¹ Bacterial plaque formation begins when bacteria adhere to the surface of the teeth, forming a biofilm that may contain numerous pathogenic species, notably gram-negative anaerobic bacteria and the gram-positive species *Staphylococcus aureus*.²

S. aureus expresses numerous virulence factors, including the *icaADBC* operon, which encodes biofilm components, toxins, and the family of MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) consisting of *fnbA* and *fnbB* (fibronectin-binding protein A and B), *spa* (Staphylococcal protein A), *clfB* (clumping factor B), *cna* (collagen adhesin), *bbp* (sialoprotein-binding protein), *ebp5* (elastin-binding protein of *S. aureus*), *map/eap* (extra-cellular adhesion protein), *sdrC*, *sdrD*, and *sdrE* (serine aspartate repeat proteins C, D, and E) genes.^{3,4}

The frequency of *S. aureus* strains associated with periodontitis has been poorly studied,^{5,6} and to our knowledge, the expression of its adhesion genes has never been studied. Although *S. aureus* has been considered as a transient member of the oral microbiota, its isolation and characterization is important, because it could contribute to the horizontal transfer of genes encoding antibiotic resistance and virulence factors to other bacteria present in the complex bacterial community of the teeth. The purpose of this study was to characterize the *S. aureus* strains isolated from periodontal lesions. In order to that, we determine the expression of genes involved in cell adhesion and biofilm formation in an *in vitro* model of infection of human cells and the antibiotic-resistant phenotypes in *S. aureus* isolated from periodontal lesions of patients suffering from gingivitis, moderate periodontitis, or advanced periodontitis.

Methods

Sample collection

A total of 268 patients (152 women and 116 men) with moderate (n = 26) or advanced periodontitis (n = 13) or gingivitis (n = 11) were enrolled in this study. The patients

were from the Endoperiodontología Clinic of the Higher Studies Faculty Iztacala, National Autonomous University of Mexico and from a dental clinic Tláhuac, Mexico City. The study was carried out after the approval of the Institutional Review Board (Comisión de Ética y Bioseguridad; approval number 00012 of March 18, 2016) and after obtaining informed consent from each patient. Patients who smoke or received periodontal or antibiotic treatment in the past six months were excluded from this study. Patients with gingivitis did not have periodontal pockets or insertion-loss of more than 3 mm. Patients with moderate or advanced periodontitis had periodontal pockets (more than 4 mm) and loss of dental insertion of 5 mm. Samples were taken by a sterile swab from periodontal pockets of more than four mm of depth and immediately cultured in brain heart infusion (Bioxon Mexico) and then on S-110 (*Staphylococcus* N° 110, MCD LAB Mexico) solid media under aerobic condition at 37 °C for 24 h.

Identification of *S. aureus*

S. aureus strains were identified by bacteriological and biochemical tests including mannitol, coagulase, and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 23S *rRNA*, *nuc*, *spa* x region, and *coa* genes.⁷

Resistance to antibiotics

Susceptibility to antibiotics of the *S. aureus* strains was determined by the Kirby–Bauer method.⁸ The 12 antibiotics tested were dicloxacillin (DC, 1 µg), penicillin (PE, 10 U), ampicillin (AM, 10 µg), erythromycin (E, 15 µg), cephalothin (CF, 30 µg), pefloxacin (PEF, 5 µg), levofloxacin (LEV, 5 µg), cefuroxime (CXM, 30 µg), cefepime (FEP, 30 µg), gentamicin (GE, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg), and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 25 µg). The identification of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains was performed according to the CLSI M07-A7 publication.⁹ *S. aureus* ATCC 25923 (*mecA*-) and ATCC 33592 (*mecA*+) were used as controls.

Identification of *mecA*, *icaAB*, and detection of genes of the MSCRAMM family by PCR

The PCR conditions employed to amplify *mecA* and *icaAB* are as previously described.^{10,11} Amplification of the *spa*,

Please cite this article as: Uribe-García A et al., Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.05.010>

fnbA, *fnbB*, *clfB*, *cna*, *bbp*, *ebpS*, *map/eap*, *sdrC*, *sdrD*, and *sdrE* genes were as described elsewhere.¹²

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing

To determine the PFGE type, chromosomal DNA was prepared and digested with *Sma*I as previously described.¹³ The DNA restriction fragments were separated using the CHEF-DR II system (Bio-Rad). The gels were photographed using a Bio-Rad Gel Doc. The PFGE patterns were compared according to the criteria of Tenover et al.¹⁴ and were analysed with the Gene Tool software and Gene Directory software (Syngene, United Kingdom). *S. aureus* NCTC 8325 was included in each gel for band normalization. Percent similarities were obtained from the unweighted pair group with mathematical average (UPMGA) based on Dice coefficients. Band position tolerance was set at 1.25%. A similarity coefficient of 80% was selected to define the pulsed-field cluster types.¹³

Inoculation of the human epithelial cell line A549 with the *S. aureus* strains

In order to induce the expression of adhesion genes of the *S. aureus* strains, we used an *in vitro* model of infection of the human cell line A549. A total of 2×10^6 *S. aureus* cells suspended in 50 μ L of PBS were inoculated onto the surface of the cultured human cells and incubated at 37 °C for 72 h with 5% CO₂ and saturated humidity. The maintenance media (F12K plus 10% bovine foetal serum) was changed every 24 h.

RNA purification and reverse transcription

S. aureus cells were harvested from the surface of the A549 cell culture and suspended in 1000 μ L of the RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Germany). The sample was agitated in a vortex for 30 s and incubated at room temperature for 5 min. The sample was then centrifuged at 10 000 rpm for 10 min in order to obtain the bacterial cells at the bottom. The automatic purification of RNA was conducted in a robotized equipment QIAcube (Qiagen) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The method includes the bacterial lysis with TE buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) containing 10 mg/mL of lysozyme. The concentration and purity of total RNA was determined in a spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). The synthesis of cDNA was carried out using the Reverse transcription QuantiTect kit (Qiagen).

Gene expression analysis using real-time PCR

The primers used to determine the expression of the genes *coa*, *spa*, *fnbA*, *fnbB*, *clfB*, *cna*, *bbp*, *ebpS*, *map/eap*, *sdrC*, *sdrD*, and *sdrE* by real-time PCR were previously described.¹² The Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen) was used for the real-time PCR. The melting point was used in each experiment and the internal control was the rRNA. *S. aureus* ATCC 33592 was used as a positive control.

Quantification of biofilm formation by *S. aureus*

Quantification of biofilm formation by the *S. aureus* strains was performed by biofilm adhesion to polystyrene microtiter plates according to Moretro et al.¹⁵ *S. aureus* strains ATCC 35984, and ATCC 12228 were used as positive and negative control, respectively.

Results

S. aureus was identified using microbiological and molecular methods in 18.6% (50/268) of the total samples from patients with periodontal disease. All MRSA strains ($n = 50$) were resistant to ampicillin, dicloxacillin, cefotaxime, and penicillin (Table 1). All the strains were multidrug resistant (resistant at least to three antibiotics from different families). They were resistant to six to twelve antibiotics; one strain was resistant to six antibiotics, nine were resistant to eight antibiotics, seven were resistant to nine antibiotics, fifteen were resistant to ten antibiotics, eleven were resistant to eleven antibiotics, and seven were resistant to twelve antibiotics. All strains were carriers of the *spa*, *coa*, and *icaAB* genes (Fig. 1); 96% ($n = 48$) of strains were carriers of *clfB*, and 88% ($n = 44$) were carriers of *ebpS* or *sdrD*. The less frequent genes were *cna* (32%) and *fnbB* (30%) (Fig. 1).

The PFGE analysis of 48 strains showed 37 different pulsed field types (PFTs), and most strains had a unique PFT (29/48, 60.4%; Fig. 2). Pairs of strains that shared the same PFT were also found, including strains 6–61, 80–81, 44–45, 109–110 and 37–38. Two larger groups of strains that had the same PFT were also detected and were composed by strains 78-73-75-76-77 and 42-50-40 (Fig. 2).

The distribution of *spa*, *coa*, *clfB*, *ebpS*, *sdrC*, and *icaAB* was more frequent in the strains isolated from patients with moderate periodontitis (Table 2). Some strains belonging to the same PFT (73, 75, 76, 77, 78) were isolated from patients with different diagnosis (Table 2).

We identified 24 distinct patterns of adhesion markers and antibiotic-resistant phenotypes in the MRSA strains (Table 3). Sixteen percent of the strains ($n = 8$) presented

Table 1 Antibiotic-resistance of *S. aureus* strains isolated from periodontal lesions.

Antibiotic	Resistant	Susceptible
	Number (%)	Number (%)
Ampicillin	50 (100)	0 (0)
Dicloxacillin	50 (100)	0 (0)
Cefotaxime	50 (100)	0 (0)
Penicillin	50 (100)	0 (0)
Cefalotin	48 (96)	2 (4)
Gentamicin	44 (88)	6 (12)
Erythromycin	43 (86)	7 (14)
Pefloxacin	37 (74)	13 (26)
Tetracycline	36 (72)	14 (28)
Trimethoprim-sulfamethoxazole	36 (72)	14 (28)
Levofloxacin	30 (60)	20 (40)
Cefuroxime	21 (42)	29 (58)

Please cite this article as: Uribe-García A et al., Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.05.010>

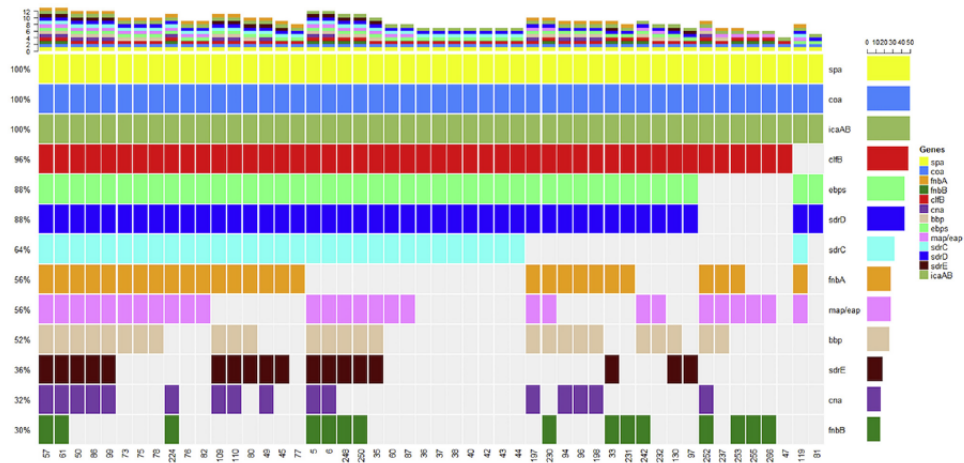


Figure 1. Distribution of virulence genes of the MRSA strains. The grid panel depicts the virulence genes found in each MRSA strain color-coded for each gene. Top bar plot: number of virulence genes amplified. Right axis: gene name. Right plot: absolute frequency of amplification for each gene. Bottom axis bacterial strain id number. Left axis: relative frequency of amplification per gene.

pattern No. 1 (*spa/coa/clfB/ebps/sdrC/sdrD/icaAB/CF/AM/CTX/PE/GE/DC*); this pattern was found in strains isolated from gingivitis ($n = 2$), moderate ($n = 3$), or advanced periodontitis ($n = 3$). Pattern No. 2 was found in strains isolated from gingivitis ($n = 2$) and moderate periodontitis ($n = 2$), and pattern No. 3 in strains from moderate ($n = 2$) and advanced periodontitis ($n = 2$) representing 8% ($n = 4$) of the total strains (Table 2). Pattern No. 8, which had only two strains (from advanced periodontitis), was characterized as possessing all thirteen virulence markers and resistance to ten antibiotics.

After infection of the human epithelial cells, we found that all the *S. aureus* strains ($n = 50$) were able to express several virulence genes. Sixty-six percent ($n = 33$) of the strains expressed 7–12 genes, and 34% ($n = 17$) expressed 4–6 genes (data not shown). The most frequently expressed genes were *spa*, *coa*, *ebps*, and *sdrD* (Table 4), mainly in strains from patients with moderate or advanced periodontitis. The percentages of expression of the virulence genes were higher and the genes involved in biofilm formation were more frequent in strains from moderate periodontitis (Table 4).

Discussion

Periodontal diseases affect up to 90 percent of the world's population and occur primarily in developing countries.¹⁶ More than 500 aerobic and anaerobic bacterial species have been associated with periodontal diseases, among them is *S. aureus*.^{2,17} In this study, *S. aureus* was identified by standard microbiological and molecular methods in 18.6% ($n = 50$) of the samples from patients with periodontal disease ($n = 268$). This percentage is similar to the

20% and 23% numbers reported in other studies on *S. aureus* isolated from environmental surfaces, hands, anterior nares, and nasal swabs in dental health care facilities.^{18,19} One hundred percent ($n = 50$) of the *S. aureus* strains isolated were resistant to methicillin. This percentage is higher than that reported in other studies for *S. aureus* isolated from patients with periodontal disease or from patients with other dental disorders.^{20–22} In Mexico, significantly more dental students are nasal and pharyngeal carriers of MRSA than non-dental students, and it has been suggested that dental students are occupationally exposed to MRSA.²³

Although, currently there are several methodologies for typing of *S. aureus*, PFGE is a powerful method for differentiating between *S. aureus* strains.²⁴ PFGE analysis of 48 of the strains showed 37 distinct PFTs (Fig. 2). Most strains had a unique PFT (29/48; 60.4%). However, strains with the same PFT were identified (No. 73, 75, 76, 77 and 78; Table 2) from distinct patients with gingivitis (strains No. 76 and 78), moderate periodontitis (strains 75 and 77), and advanced periodontitis (strain No. 73). Other strains with the same PFTs were no. 40, 42, 50, and also 80, 81 (Table 2). All these strains were multidrug resistant (100% resistant to 6–12 antibiotics), and the large number of the PFTs reflects a broad genomic diversity of the *S. aureus* pathogenic strains that infect periodontal lesions. To our knowledge, this is the second work that reports pulse field electrophoretic typing of *S. aureus* in Mexico, following one previous study from our group.⁷ More studies are needed to better define the genomic characteristics and the clonal distribution of this pathogens in the Mexican population.

We previously demonstrated high incidence of resistance to penicillin, ampicillin, erythromycin, dicloxacillin, and trimethoprim/sulfamethoxazole in MRSA strains isolated

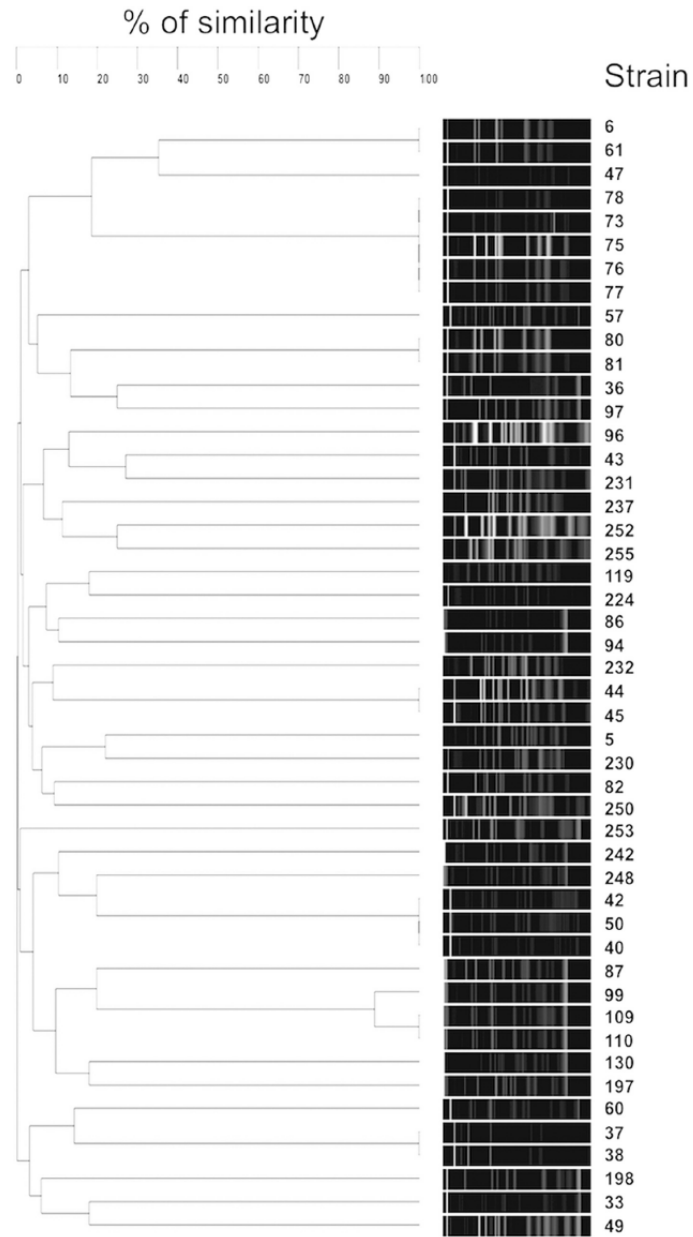


Figure 2. Smal-PFGE dendrogram comparing the MRSA strains. To define the pulsed-field type clusters, percent similarities were obtained from the unweighted pair group with mathematical average (UPMGA) based on Dice coefficients. A similarity coefficient of 80% was selected.

Please cite this article as: Uribe-García A et al., Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.05.010>

Table 2 Virulence genes of *S. aureus* strains isolated from periodontal lesions.

Diagnosis	Virulence genes of the MRSA strains (n=50)													Strains with the same PFGE
	<i>spa</i>	<i>coa</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>bbp</i>	<i>ebps</i>	<i>map/eap</i>	<i>sdrC</i>	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>icaAB</i>	
Gingivitis (n=11)	11	11	6	4	11	1	5	6	8	6	6	2	11	40 42 76 78 80
Moderate periodontitis (n=26)	26	26	16	7	25	8	12	25	12	17	25	11	26	38 45 50 75 77 109 110
Advanced periodontitis (n=13)	13	13	6	4	12	7	9	13	8	9	13	5	13	6 61 37 44 73 81
No. (%)	50 100	50 100	28 56	15 30	48 96	16 32	26 52	44 88	28 56	32 64	44 88	18 36	50 100	

from the anterior nostrils and catheters of haemodialysis patients.⁷ The presence of multidrug-resistant strains has led to a reduction in treatment alternatives and an increase in bacterial persistence. The percentages of the strains resistant to penicillin and ampicillin are similar to those reported for *S. aureus* strains associated with periodontitis, whereas the percentages of strains resistant to gentamicin, erythromycin, trimethoprim, and tetracycline are higher.² The frequency of MRSA strains in dental patients from other countries has been extremely low, or practically nil.^{5,20,25}

This high frequency occurrence of antibiotic resistant strains is striking and perhaps is related to the availability of antibiotics without prescription that had been occurring in Mexico until 2010. Since penicillin, tetracycline, and macrolide are among the more common antibiotics used in the periodontal treatment, the results presented here should concern clinicians selecting antibiotic treatment for patients with periodontitis.²⁶

The ability of *S. aureus* to adhere to human epithelial cells is considered the first step in the colonization and invasion by these bacteria. In this study, the MSCRAMM genes that were most frequently identified among the MRSA strains were *spa*, *clfB*, *ebps*, *sdrD*, and *sdrC*; whereas, the least frequent genes were *fnbB* and *sdrE* (Fig. 1). The frequency of occurrence of adhesion genes in MRSA strains isolated from periodontal disease has not been studied previously. The percentages reported in this study are similar to those described in a study on the genotypic characteristics of MRSA and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) strains isolated from skin infections of patients from different geographic areas, as well as those previously described in MRSA strains isolated from the nostrils and catheters of haemodialysis patients.^{7,12} Nashev

et al.²⁷ reported high frequencies of *clfA* and *fnbA* in *S. aureus* strains isolated from nasal carriers. The high frequency of genes from the MSCRAMM family in these strains indicates their ability to adhere to other anatomical sites and cause other infections, because the surface proteins encoded by these genes recognize host components such as collagen, fibrinogen, and fibronectin.²⁸ It has been shown that the binding of the Cna protein (encoded by the *cna* gene) to collagen is associated with endocarditis and keratitis.^{29,30} The fibronectin binding proteins (FnBA and FnBB) mediate the adherence of the bacteria to the human airway epithelium.³¹ The adhesion to fibrinogen by ClfA and ClfB plays an important antiphagocytic role, both against neutrophils and macrophages.^{32,33} ClfB has also been shown to be involved in respiratory infections.³⁴

Eighty-eight percent (n = 44) of the strains tested were able to form biofilms (Table 4) indicating its ability to avoid the host immune response and action of antibiotics.⁴ This protection is likely conferred to *S. aureus*, as well as to the other microorganisms associated with the biofilm. The formation of the biofilm allows the persistence and chronicity of the infections and increases the horizontal transfer of plasmid-borne antibiotic resistance genes.^{35,36}

The frequency at which the *icaAB* operon occurs in periodontal MRSA is very similar to that previously described in MRSA strains that were isolated from the anterior nostrils and catheters of haemodialysis patients and is higher than that reported for *S. aureus* strains isolated from infections associated with catheters.^{7,37}

Strains with distinct patterns of adhesion genes and antibiotic resistance phenotypes associated with gingivitis, moderate or advanced periodontitis were identified (Table 3). These results are relevant because, to our knowledge, they demonstrate for the first time the high-level

Table 3 Patterns of virulence genes and antibiotic resistance phenotypes^a in *S. aureus* strains isolated from periodontal lesions.

Pattern number	Virulence genes													Resistance to antibiotics										Diagnosis (n = 50)		Number of strains		Number of % strains					
	<i>spa</i>	<i>coa</i>	<i>fnbA</i>	<i>B</i>	<i>fnbB</i>	<i>cifB</i>	<i>cna</i>	<i>bbp</i>	<i>ebps</i>	<i>map</i>	<i>sdrC</i>	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>icaAB</i>	CF	E	AM	SXT	CTX	CXM	PEF	PE	LEV	TE	GE	DC	Gingivitis		Moderate P.	Advanced P.			
1	+	+			+					+	+			+	+	+	+	+									+	+	2	3	3	8	16
2	+	+	+		+					+	+			+	+	+	+	+									+	+	2	2	0	4	8
3	+	+	+		+	+	+							+	+	+	+	+									+	+	0	2	2	4	8
4	+	+	+	+										+	+	+	+	+									+	+	0	3	0	3	6
5	+	+	+		+									+	+	+	+	+									+	+	1	1	1	3	6
6	+	+	+		+									+	+	+	+	+									+	+	0	2	2	2	4
7	+	+	+		+									+	+	+	+	+									+	+	0	2	0	2	4
8	+	+	+	+	+									+	+	+	+	+									+	+	0	2	2	2	4
9	+	+	+		+									+	+	+	+	+									+	+	0	1	1	2	4
10	+	+	+		+									+	+	+	+	+									+	+	0	2	0	2	4
11	+	+			+									+	+	+	+	+									+	+	0	1	1	2	4
12	+	+		+	+									+	+	+	+	+									+	+	0	2	0	2	4
13	+	+	+	+										+	+	+	+	+									+	+	2	0	0	2	4
14	+	+		+	+									+	+	+	+	+									+	+	2	0	0	2	4
15-24	Other combinations																												2	7	1	10	20
Total																													11	26	13	50	100

^a CF cefalotin, E erythromycin, AM ampicillin, SXT trimethoprim-sulfamethoxazole, CTX cefotaxime, CXM cefuroxime, PEF pefloxacin, PE penicillin, LEV levofloxacin, TE tetracycline, GE gentamicin, DC dicloxacillin.

Table 4 Expression of virulence genes in *S. aureus* strains isolated from periodontal lesions.

Expressed gene	Gingivitis No. (%)	Moderate periodontitis No. (%)	Advanced periodontitis No. (%)	Total No. (%)
<i>spa</i>	9 (18)	24 (48)	12 (24)	45 (90)
<i>coa</i>	9 (18)	21 (42)	10 (20)	40 (80)
<i>fnbA</i>	5 (10)	13 (26)	5 (10)	23 (46)
<i>fnbB</i>	3 (6)	7 (14)	4 (8)	14 (28)
<i>clfA</i>	3 (6)	6 (12)	4 (8)	13 (26)
<i>clfB</i>	7 (14)	7 (14)	5 (10)	19 (38)
<i>cna</i>	1 (2)	8 (16)	7 (14)	16 (32)
<i>bbp</i>	5 (10)	12 (24)	8 (16)	25 (50)
<i>ebps</i>	6 (12)	25 (50)	13 (26)	44 (88)
<i>map/eap</i>	8 (16)	10 (20)	9 (18)	27 (54)
<i>sdrC</i>	5 (10)	15 (30)	9 (18)	29 (58)
<i>sdrD</i>	6 (12)	25 (50)	13 (26)	44 (88)
<i>sdrE</i>	2 (4)	11 (22)	5 (10)	18 (36)
Biofilm +	10 (20)	21 (42)	13 (26)	44 (88)

expression of virulence genes and antibiotic resistance in *S. aureus* strains associated with periodontal disease. The different expression profiles of genes involved in adhesion, invasion, and evasion of the immune response, in combination with multidrug resistance to antibiotics, increase the acuteness and spread of infection.³⁸

In the *in vitro* model of infection of human epithelial cells, we found that most *S. aureus* strains were able to express simultaneously 7–12 genes (data not shown). From these results, we suppose that the multidrug resistant *S. aureus* strains associated with periodontal lesions have a great capacity to express virulence genes, and since most of them form biofilm (88%, n = 44), they might cause severe infections of the buccal cavity or other body sites. Also, we hypothesize they may act as a source of genes for other bacteria by horizontal gene transfer. In conclusion, these results show that the MRSA strains isolated from periodontal diseases are genetically distinct, express multiple adhesion genes, and are resistant to multiple antibiotics. This is the first study conducted in Mexico about virulence markers and antibiotic resistance in MRSA strains isolated from periodontal diseases. Although *S. aureus* has not been considered as an etiologic agent of periodontitis,⁶ we hypothesize that these strains present in the periodontal pockets could contribute genes for virulence, or for antibiotic resistance, by horizontal genetic transfer to other members of the complex bacterial community of the teeth.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

Alina Uribe-García is a doctoral student at Doctorado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de

México (UNAM) at Facultad de Estudios Superiores Iztacala. We thank Ma. Patricia Sánchez Yáñez for her technical assistance. This investigation was funded by FES Iztacala, UNAM [FESI-DIP-PAPCA 2016–26].

References

- Slots J. Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontol* 2000 2013;62(1):7–19.
- Kim GY, Lee CH. Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. *J Periodontol Implant Sci* 2015;45:223–8.
- Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998;6:484–8. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01400-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01400-0).
- Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367–78.
- Fritsch BZ, Albert-Kiszely A, Persson GR. *Staphylococcus aureus* and other bacteria in untreated periodontitis. *J Dent Res* 2008;87:589–93.
- Koukos G, Sakellari D, Arsenakis M, Tsalikis L, Slini T, Konstantinidis A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Arch Oral Biol* 2015;60:1410–5.
- Paniagua CGL, Monroy PE, Gutiérrez LR, Sainz ET, Bustos MJ, Vaca S. Genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and catheter of ambulatory hemodialysis patients in Mexico. *Folia Microbiol (Praha)* 2014;59:295–302.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. In: *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test*. 11th ed., vol. 32. Wayne, PA: CLSI; 2012a. No. 1. Approved standard M02-A11.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. In: *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 9th ed., vol. 32. Wayne, PA: CLSI; 2012b. No. 2. Approved standard, M07-A7.
- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994;32:1768–72.
- Martin LJV, Pérez RE, Claverie MF, Diez GO, Batista N, Morales M, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. *J Clin Microbiol* 2002;40:1569–70.
- Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae IG, Stryjewski ME, Federspiel JJ, et al. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol* 2008;46:678–84.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003;41:5113–20.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- Moretto T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5648–55.
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809–20.

Please cite this article as: Uribe-García A et al., Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.imi.2019.05.010>

17. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:66–77.
18. Han SH, Song IS, Kim JK, Park JG, Park JH, Myeong JL, et al. Monitoring of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal swabs obtained from dental clinic healthcare providers and medical environment nurses. *Int J Oral Biol* 2010;35:7–12.
19. Khairalla AS, Wasfi R, Ashour HM. Carriage frequency, phenotypic, and genotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dental health-care personnel, patients, and environment. *Sci Rep* 2017;7:7390.
20. Zimmerli M, Widmer AF, Dangel M, Filippi A, Frei R, Meyer J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among dental patients: a problem for infection control in dentistry? *Clin Oral Investig* 2009;13:369–73.
21. Apolonio AAN, Acosta GAE, Bustos MJ, Sánchez PL, Hamdan PA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among dental patients. *Am J Infect Contr* 2011;39:254–5.
22. Cuesta AI, Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Rosa AC. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in oral mucosa and pockets of patients with gingivitis-periodontitis. *Acta Odontol Latinoam* 2011;24:35–40.
23. Martínez RFJ, Carrillo ETY, Bustos MJ, Hamdan PA, Sánchez PL, Acosta GAE. Higher prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among dental students. *J Hosp Infect* 2014;86:216–8.
24. Miao J, Chen L, Wang J, Wang W, Chen D, Li L, et al. Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microb Pathog* 2017;107:17–28.
25. Buonavoglia A, Latronico F, Greco FM, D'Abramo M, Marinaro M, Mangini F, et al. Methicillin-resistant staphylococci carriage in the oral cavity: a study conducted in Bari (Italy). *Oral Dis* 2010;16:465–8.
26. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol* 2014;85:160–9.
27. Nashev D, Toshkova K, Salasia SI, Hassan AA, Lämmle C, Zschöck M. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett* 2004;233:45–52.
28. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:585–617.
29. Hienz SA, Schennings T, Heimdahl A, Flock JI. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J Infect Dis* 1996;174:83–8.
30. Rhem MN, Lech EM, Patti JM, McDevitt D, Höök M, Jones DB, et al. The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. *Infect Immun* 2000;68:3776–9.
31. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E, et al. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 2002;70:620–30.
32. Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E. Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microb Infect* 2004;6:188–95.
33. Higgins J, Loughman A, van Kessel KP, van Strijp JA, Foster TJ. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 2006;258:290–6.
34. Vernachio J, Bayer AS, Le T, Chai YL, Prater B, Schneider A, et al. Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in an experimental model of infective endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3400–6.
35. Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1968–70.
36. Figueiredo AMS, Ferreira FA, Beltrame CO, Côrtes MF. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Crit Rev Microbiol* 2017;43:602–20.
37. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001;39:2151–6.
38. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:49–62.