



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL  
MICROBIOMA ORAL HUMANO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA :**

**MARINA ENSINA HERNÁNDEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2015**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: NORMA ANGELICA CASTELLANOS CHÁVEZ

SECRETARIO: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

1er. SUPLENTE: BEATRIZ RUÍZ VILLAFÁN

2° SUPLENTE: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, ANEXO DEL LABORATORIO 1-A, DEPTO.  
BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO  
DISTRITO FEDERAL.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

---

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

---

SUSTENTANTE:

MARINA ENSINA HERNÁNDEZ

---

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. GENERALIDADES</b>	<b>4</b>
<b>2.1 HISTORIA E IMPORTANCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS Y EL FENÓMENO DE RESISTENCIA</b>	<b>4</b>
<b>2.2 ANTIBIÓTICOS</b>	<b>7</b>
<b>2.3 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA BACTERIA</b>	<b>8</b>
<b>2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN</b>	<b>9</b>
2.4.1 Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular	<b>9</b>
2.4.2 Antibióticos que alteran a la membrana citoplasmática	<b>10</b>
2.4.3 Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos	<b>10</b>
2.4.4 Antibióticos que inhiben la síntesis proteica	<b>11</b>
2.4.5 Antibióticos del grupo antimetabolitos	<b>13</b>
2.4.6 Ampicilina	<b>14</b>
2.4.7 Cefotaxima	<b>14</b>
2.4.8 Pruebas de sensibilidad bacteriana a los antibióticos	<b>15</b>

2.4.9	Uso de antibióticos en animales para consumo humano	17
2.4.10	El microbioma humano y los antibióticos	19
<b>2.5</b>	<b>RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS</b>	<b>20</b>
2.5.1	Tipos de resistencia bacteriana	22
<b>2.6</b>	<b>ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES</b>	<b>22</b>
2.6.1	Plásmidos	23
2.6.2	Transposones	24
2.6.3	Integrone y <i>cassettes</i> genéticos	26
<b>2.7</b>	<b>TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES EN BACTERIAS</b>	<b>27</b>
2.7.1	Transformación	27
2.7.2	Transducción	27
2.7.3	Conjugación	28
<b>2.8</b>	<b>MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS</b>	<b>29</b>
2.8.1	Inactivación y/o modificación del antibiótico	29
2.8.2	Alteración del sitio donde los antibióticos ejercen su acción	31
2.8.3	Modificación de la permeabilidad de la membrana	32

<b>2.9 BOMBAS DE EXPULSIÓN</b>	<b>33</b>
2.9.1 Familias de bombas de expulsión	35
2.9.1.1 Familia MFS	37
2.9.1.2 Familia SMR	38
2.9.1.3 Familia RND	39
2.9.1.4 Familia MATE	40
2.9.1.5 Familia ABC	41
<b>2.10 BROMURO DE ETIDIO</b>	<b>43</b>
<b>2.11 PREVENCIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA</b>	<b>44</b>
<b>2.12 MICROBIOMA DE LA CAVIDAD ORAL HUMANA</b>	<b>45</b>
<b>2.13 LA PLACA DENTAL: UN TIPO DE BIOFILM</b>	<b>47</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL	49
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	49
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>49</b>
<b>5. METODOLOGÍA EMPLEADA</b>	<b>50</b>

<b>5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>50</b>
5.1.1 TOMA DE MUESTRAS	50
5.1.2 CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LAS MUESTRAS	51
5.1.3 SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	51
5.1.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	52
5.1.5 ANTIBIOGRAMA (MÉTODO DE KIRBY-BAUER)	53
5.1.6 RÉPLICA EN PLACA (REPLICA PLATING)	54
5.1.7 PRUEBA DE BROMURO DE ETIDIO	55
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>

## 1. RESUMEN

Desde el momento en que Fleming descubrió accidentalmente a la penicilina en 1928 cambió el panorama devastador que se estaba viviendo hasta ese momento, cuando miles de personas y animales morían afectados por infecciones bacterianas. Luego, cuando variaron las tasas de mortalidad en el ámbito mundial de tal manera que las enfermedades que ocuparon el primer lugar fueron el cáncer y la hipertensión, se pensó que la batalla contra las bacterias patógenas estaba por terminar. Esta idea cambió radicalmente cuando aparecieron bacterias que debido al uso excesivo e indiscriminado de los antibióticos empezaron a ser resistentes a ellos, dificultando la recuperación de los enfermos, lo que despertó en la comunidad científica mundial el interés por descubrir los mecanismos que utilizaban estas bacterias para volverse resistentes (Sánchez,2012).

La resistencia a los antibióticos es actualmente un grave problema mundial de salud pública, el cual se ha incrementado desde la aparición de los primeros medicamentos antimicrobianos y de su uso indiscriminado en diferentes actividades humanas como son su utilización en patologías que no necesitan este tipo de medicación, en la agricultura y veterinaria para evitar la enfermedad de animales y lograr su rápido crecimiento. Las bacterias, ante este tipo de presión, han incrementado la utilización de mecanismos que evaden la acción de estos antibióticos o, en su defecto, han incrementado la tasa de mutaciones que les permiten salir ilesas ante este ataque químico (Cabrera, 2008).

El continuo estudio sobre este fenómeno ha permitido entender cómo las bacterias pueden superar la estrategia terapéutica mediante intercambio genético. Se han identificado diversos mecanismos para transferir la resistencia entre bacterias de la misma especie y a especies diferentes, gracias al intercambio de genes, que implica la participación de elementos tales como los plásmidos, las secuencias de inserción, los integrones y los transposones, los cuales permiten la recombinación genética, de tal forma que elementos genéticos de dos orígenes diferentes se



reúnan en una sola unidad, a través de tres mecanismos: la transformación, la transducción y la conjugación (Sánchez, 2012).

La transferencia horizontal de genes entre las células bacterianas puede dar lugar a nuevos microorganismos resistentes y a nuevas combinaciones de los genes, llevando a diversos patrones de la resistencia. Estos mecanismos pueden llevar a que una bacteria se torne resistente a múltiples agentes antibacterianos por lo que son denominadas multirresistentes (definiéndose como resistencia a dos o más clases de medicamentos) (Cabrera, 2008).

La transmisión de la resistencia se puede producir por mutación, pero fundamentalmente por adquisición de material genético exógeno tanto en bacterias patógenas como en aquellas pertenecientes a la flora comensal de hombres y animales. La transmisibilidad de los factores de resistencia, sumado a la aparición de fenotipos bacterianos que expresan resistencia a un amplio rango de antibióticos, puede dar lugar a un problema aún mayor que es la multirresistencia a antibióticos (Marchetti, 2011).

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico debido a que las bacterias poseen diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, tales como: producción de enzimas, pérdida de porinas, alteración de moléculas blanco y expulsión de antibióticos. Este último ha incrementado considerablemente su importancia, ya que el número de cepas multirresistentes a antibióticos que los poseen ha aumentado en todo el mundo (Sussmann, 2001).

Para neutralizar efectivamente la resistencia bacteriana a los antibióticos y, por consiguiente, para evitar el surgimiento de cepas multirresistentes que disminuyan la probabilidad de controlar las infecciones producidas por ellas, es necesario que la investigación en este campo esté encaminada a destruir sus mecanismos genéticos de defensa interviniendo en sus procesos moleculares (Sánchez, 2012).

La cavidad oral es una de las zonas anatómicas de nuestro organismo con mayor número y variedad de bacterias. Estos microorganismos interactúan tanto entre sí como con el medio oral estableciendo un complejo ecosistema dinámico donde se pueden encontrar de forma simultánea bacterias residentes y transeúntes ocasionales (Maestre, 2002).

Los microorganismos que se encuentran en la cavidad oral humana se han referido como la microflora oral, microbiota oral, o más recientemente como el microbioma oral. Definimos el microbioma oral humana como todos los microorganismos que se encuentran sobre o en la cavidad oral humana y sus extensiones contiguas (parando en el esófago distal) (Dewhirst, 2010).

En el presente trabajo se decidió aislar bacterias cultivables del microbioma oral de voluntarios humanos asintomáticos (específicamente de dientes y encías) para determinar si existen bacterias resistentes o multirresistentes a diferentes tipos de antibióticos. Para ello se llevaron a cabo varias pruebas: antibiograma, prueba de bromuro de etidio y replica plating.

Se obtuvieron cepas de muestras orales de individuos asintomáticos, las cuales presentaron resistencia a diversos antibióticos, esto se observó mediante los antibiogramas.

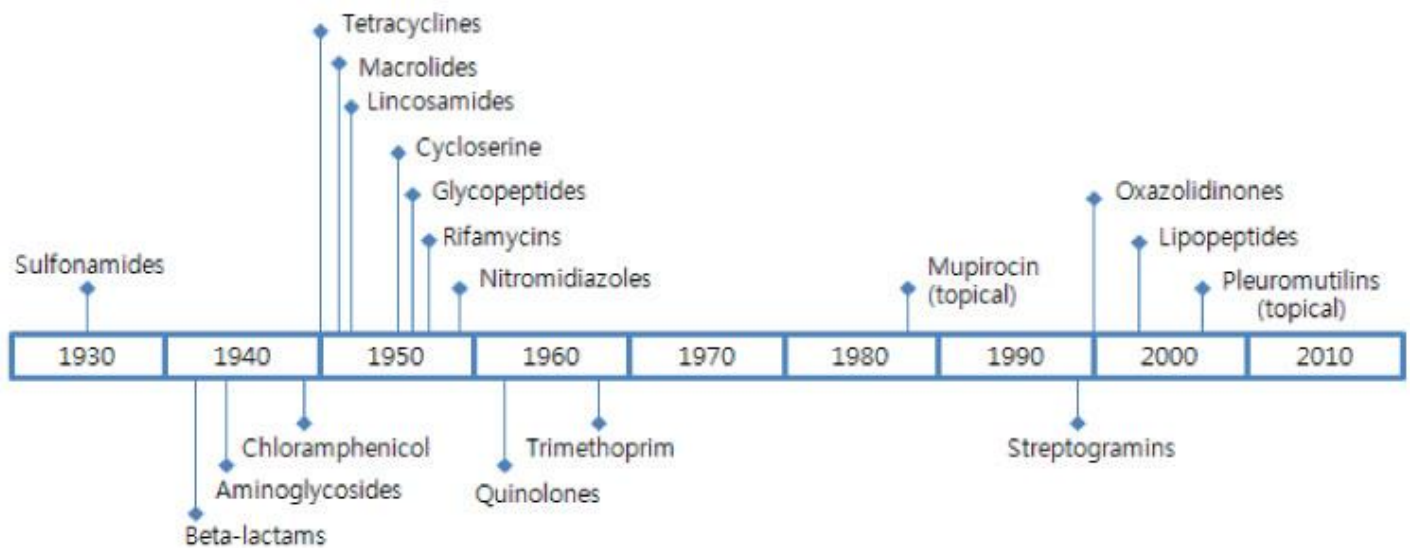
Se determinó el porcentaje total de resistencia de cada una de las muestras originales, haciendo uso de dos antibióticos: ampicilina y cefotaxima; se observó una mayor resistencia a la ampicilina.

Finalmente, se estudió cualitativamente la actividad de bombas de expulsión empleando al bromuro de etidio observándose crecimiento de todas las cepas utilizadas en presencia de este agente tóxico.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 HISTORIA E IMPORTANCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS Y EL FENÓMENO DE RESISTENCIA

El descubrimiento de la penicilina, que fue el primer compuesto natural con actividad antibacteriana, supuso un hito en la historia de la Medicina y un antes y un después en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La industria farmacéutica inició una carrera para obtener nuevas moléculas de antibióticos a partir de diferentes microorganismos, preferentemente del suelo, o derivados semisintéticos de los mismos. Se descubrieron una gran variedad de estos compuestos pertenecientes a muy diversas familias ( $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, etc.). Fue la era dorada para estos fármacos y se creía que la batalla contra las enfermedades infecciosas estaba ya ganada (Torres, 2012).



**Figura 1.** Introducción de nuevas clases de antibióticos para uso humano 1930-2010 (Young, 2012).

Los antibióticos se consideraban prácticamente la “panacea” de la medicina y eran usados indiscriminadamente para tratar toda clase de infecciones (incluso algunas

de naturaleza no bacteriana). Dentro de la comunidad científica este entusiasmo no estaba tan extendido, ya que varios científicos, incluido Alexander Fleming, el descubridor de la penicilina, predijeron que el uso de los antibióticos eventualmente llevaría a la aparición de cepas resistentes a estos. Poco tiempo después de que se comenzaron a utilizar los antibióticos aparecieron cepas resistentes (las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina aparecieron solo un año después del uso difundido de dicho antibiótico) (Alanis, 2005). Posteriormente resurge esta misma cepa presentando resistencia a otro antibiótico conocido como meticilina (Pérez – Cano, 2013).

Inicialmente, el problema de resistencia bacteriana se resolvió con el descubrimiento de nuevos medicamentos como los aminoglicósidos, macrólidos y glicopéptidos, entre otros. Sin embargo, esto no es suficiente y cada vez aparecen nuevos mecanismos de resistencia que son difíciles de controlar por estos medicamentos. Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos es mucho más lento (Gold, 1996).

Desde el descubrimiento de la penicilina por Fleming, en 1928, comenzó el desarrollo de la antibioticoterapia y su uso intensivo. Poco tiempo después del descubrimiento de los primeros antibióticos se evidenciaron cepas resistentes en hospitales donde se utilizaban y la primera bacteria en la que se detectó fue *Streptococcus pyogenes* resistente a sulfonamidas en 1930. Luego, en la década de los años cuarenta, aparece resistencia a la penicilina. La resistencia simultánea a múltiples drogas se detectó por primera vez en bacterias entéricas como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* a finales de los años cincuenta y principios de los años sesenta (Levy, 2001). En la Tabla 1 se presentan, esquemáticamente los años de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y los años en que las resistencias a los mismos fueron comunicadas (Errecalde, 2004).

Antibiótico	Descubrimiento	Uso clínico	Resistencia clínica
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

**Tabla 1.**-Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos (Errecalde, 2004).

Las bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, son a menudo resistentes a  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, aminoglicósidos, quinolonas y glicopéptidos como la vancomicina, debido a proteínas codificadas y resistencia mediada por plásmidos, que es el principal mecanismo de diseminación rápida de genes de resistencia a antibióticos. Las bacterias del género *Enterococcus* son resistentes a vancomicina y esta resistencia está codificada en plásmidos, hecho que permite la diseminación a otras bacterias con tratamientos antibióticos limitados, como es el caso de *S. aureus*, considerada una bacteria con múltiple resistencia a antibióticos (Normark, 2002).

En cuanto a la propagación de la resistencia, Lederberg acuñó en 1953 el término plásmido para referirse a elementos genéticos extracromosomales que tienen la capacidad de transferir propiedades entre bacterias al ponerse éstas en contacto directo. El término empezó a tener relevancia en la década de 1970, cuando la resistencia infecciosa a los antimicrobianos se convirtió en un problema importante para la medicina (Sánchez, 2012).

En 1968, Anderson demostró la presentación del fenómeno de transferencia de la resistencia entre enterobacterias. En 1979, Levin describió el proceso molecular de la transmisión plasmídica conjugativa. A partir de este momento se investigó el surgimiento de nuevas cepas resistentes a los nuevos antibióticos, y se lograron avances que llevaron a la determinación de la transmisión de reservorios (Sánchez, 2012).

## 2.2 ANTIBIÓTICOS

**Los antibióticos** son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio; suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Cordiés, 1998).

Su origen puede ser:

- *Natural o biológico.* Se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias.
- *Semisintético.* A partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables (Paredes, 2004).

Las características del antimicrobiano ideal serían las de aquel antibiótico que es activo frente a los microorganismos implicados en el proceso infeccioso, evitar la aparición de resistencias y conservador del equilibrio de la microbiota. Para ello debe poseer unos parámetros farmacocinéticos adecuados que permitan una buena difusión y concentración en el lugar de la infección, además de otros factores como comodidad de administración y tolerabilidad (que mejoran el cumplimiento) y pocos efectos adversos (Rodríguez – Alonso, 2009).

## 2.3 CLASIFICACIÓN SEGÚN EL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA BACTERIA

Los antibióticos se comportan: como bactericidas y como bacteriostáticos.

### **Como bactericidas**

Poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica irreversible (Córdies, 1998).

Pertenecen a este grupo los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas (Paredes, 2004).

### **Como bacteriostáticos**

Inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse.

El hecho de que un agente sea bactericida o bacteriostático depende de su mecanismo de acción y, por tanto, de su estructura, pero también contribuyen paralelamente otros factores: (Paredes, 2004).

- Concentración alcanzada en el sitio de la infección.
- Tipo de microorganismo.
- Tamaño del inóculo.
- Tiempo de acción.
- Fase de crecimiento de la bacteria.

## 2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN

Los antibióticos pueden interferir en diferentes actividades que lleva a cabo la bacteria, tales como la síntesis de sus ácidos nucleicos, proteínas, o para el procesamiento de aminoácidos o azúcares del medio, necesarios para la biosíntesis de sus paredes o membranas celulares. Los antibióticos pueden actuar en una o más áreas del funcionamiento del microorganismo y producir dos principales efectos: la muerte de la bacteria, designándose entonces como agentes bactericidas o sólo inhibir el desarrollo y reproducción del microorganismo, llamándose entonces agentes bacteriostáticos (Molina, 2014).

### 2.4.1 Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Los representantes de este grupo son las penicilinas, las cefalosporinas, los carbapenems, la vancomicina, la bacitracina, el aztreonam, entre otros; todos ellos se consideran bactericidas ya que inhiben la síntesis del peptidoglicano (principal componente de la pared bacteriana) desestabilizando la osmolaridad intracelular que lleva a la muerte celular.

El peptidoglicano es un polímero que se sintetiza en tres etapas: en la primera se forma el UDP-N acetilmuramil-pentapéptido en el citoplasma, en la segunda se polimerizan el UDP-N acetilmuramil-pentapéptido y la N-acetilglucosamina que son transportados a través de la membrana citoplasmática y se unen al punto de crecimiento de la pared bacteriana, y en la tercera etapa tras una reacción de transpeptidación catalizada por las proteínas de unión a la penicilina (*Penicillins binding proteins: PBPs*), las cadenas de peptidoglicano quedan entrelazadas transversalmente y dan lugar a la formación de un polímero tridimensional (Cabrera,2008).



Las penicilinas y cefalosporinas ( $\beta$ -lactámicos) interactúan con las PBP para inhibir las reacciones de transpeptidación involucradas en la etapa final de la síntesis del peptidoglicano. Los carbapenems y el aztreonam poseen un mecanismo de acción similar al de penicilinas y cefalosporinas (Yoneyama, 2006).

La vancomicina y la bacitracina actúan hacia la segunda etapa de la síntesis del peptidoglicano formando un complejo estequiométrico con el dipéptido D-Ala-D-Ala para prevenir las reacciones de transpeptidación involucradas en la elongación de las cadenas de peptidoglicano. (Walsh, 2000).

#### **2.4.2 Antibióticos que alteran a la membrana citoplasmática**

La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio intracelular de la bacteria. Esta membrana tiene estructura diferente para las bacterias y los hongos y puede lesionarse por algunos productos, de esta forma se obtiene una actividad antimicrobiana selectiva; antibióticos como polimixina, pristinamicina y anfotericina B poseen esta acción (Cordiés, 1998).

La membrana celular constituye una barrera de permeabilidad y lleva a cabo funciones de transporte activo. Si la integridad funcional de la membrana se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere. Las polimixinas son activas frente a bacterias Gram negativas y actúan como detergentes catiónicos sobre membranas ricas en fosfatidil-etanolamina y los poliénicos, tales como anfotericina B y la nistatina, son activos frente a hongos (Paredes, 2004).

#### **2.4.3 Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos**

Muchos antibióticos pueden interferir en diferentes niveles en la síntesis de los ácidos nucleicos. Pueden inhibir la síntesis de nucleótidos o pueden interferir con polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del ADN (Molina, 2014).

Las topoisomerasas son las enzimas encargadas del superenrollamiento y desenrollamiento del ADN, así como del corte, unión y separación de las hebras de ADN, necesarias para los procesos de síntesis de ADN.

Las quinolonas ejercen su acción bloqueando a las topoisomerasas II (ADN-girasa) y IV (Hooper, 2001). Las topoisomerasas se acoplan al ADN, provocan un pequeño corte en las hebras de ADN que posteriormente es reparado, y quedan de nuevo libres. Las fluoroquinolonas, se unen al ADN roto y a la topoisomerasa formando un complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa de forma irreversible, impidiendo que el proceso de transcripción o replicación continúen (Drlica, 2008).

La rifampicina es un antibiótico que inhibe la actividad de la RNA polimerasa bacteriana dependiente de DNA, uniéndose en forma no covalente pero muy firme a esta enzima. La RNA polimerasa es una enzima cuyas cadenas polipeptídicas se unen a un factor que confiere especificidad para el reconocimiento de los sitios promotores precisos requeridos para iniciar la transcripción del DNA. La rifampicina se une a subunidades de la RNA polimerasa e interfiere específicamente con la iniciación del proceso pero no tiene efecto después de que la polimerización se ha iniciado (Molina, 2014).

#### **2.4.4 Antibióticos que inhiben la síntesis proteica**

La síntesis de los ribosomas se realiza en tres etapas: iniciación, elongación, que comprende reconocimiento, transferencia y translocación, y terminación. El ribosoma 70S, compuesto por dos subunidades, 30S y 50S, es la unidad funcional de la síntesis de proteínas en las bacterias, en tanto que los ribosomas de los mamíferos son 80S (Paredes, 2004).

*Interferencia con la síntesis de proteínas mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S:*

Las tetraciclinas (ej. tetraciclina, minociclina y doxiciclina) se unen a la subunidad 30S del ribosoma y bloquean la adherencia del ARN de transferencia (ARNt). Puesto que no se pueden agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, la síntesis de proteínas es inhibida. La acción de las tetraciclinas es bacteriostática (Calvo, 2009).

Los aminoglucósidos (ej. gentamicina, tobramicina, amikacina, y estreptomicina) también se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes. En primer lugar, estos se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que dicha subunidad se adhiera al ARN mensajero (ARNm). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del ARNm. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros (Basualdo, 1996).

*Inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S.*

Los macrólidos (ej. eritromicina, azitromicina y claritromicina) y las lincosamidas (ej. Clindamicina, lincomicina) se adhieren a la subunidad ribosómica 50S provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos son primordialmente bacteriostáticos.

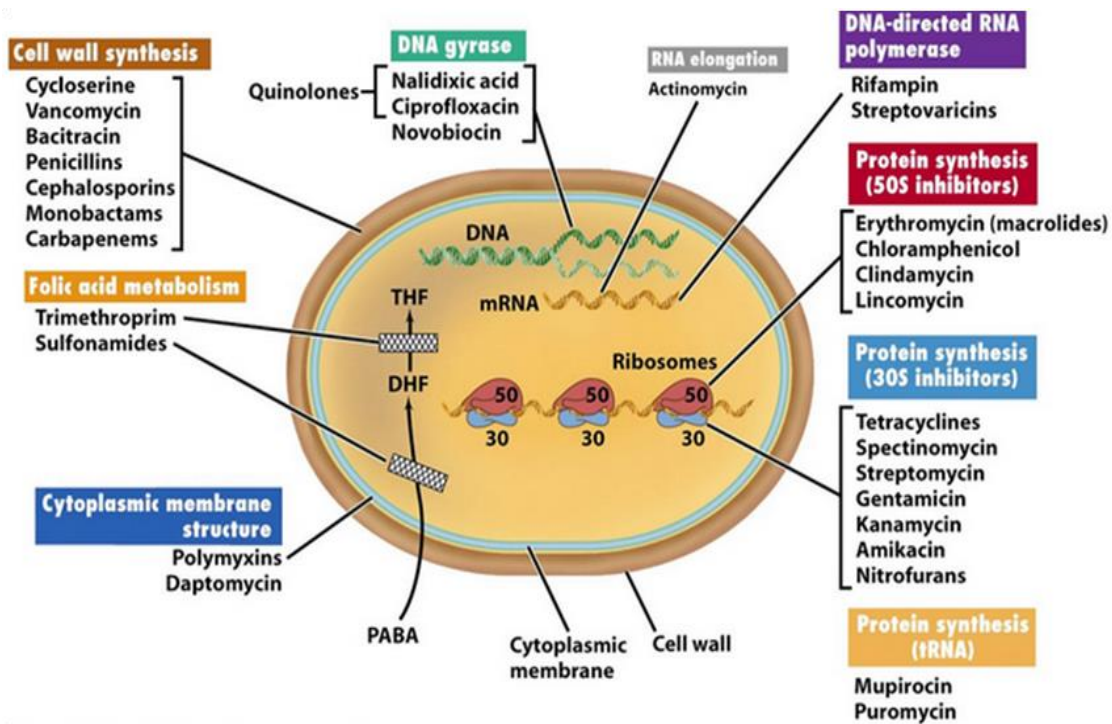
El cloranfenicol también se une a la subunidad 50S del ribosoma e interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína en crecimiento (Basualdo, 1996).

## 2.4.5 Antibióticos del grupo antimetabolitos

Ciertos antibióticos, como las sulfamidas y el trimetoprim, inhiben vías metabólicas que impiden el crecimiento bacteriano; tienen por lo tanto acción bacteriostática. Cuando ambos antimicrobianos se administran en forma conjunta, su acción es bactericida (Basualdo, 1996).

Tanto el trimetoprim como las sulfonamidas interfieren en el metabolismo de los folatos, por bloqueo competitivo en la biosíntesis de los tetrahidrofolatos precursores del ácido fólico. Las sulfonamidas bloquean competitivamente la conversión del pteridina y ácido Para-amino-benzoico (PABA) a ácido de hidrofólico.

El trimetoprim tiene una gran afinidad para la enzima dihidrofolato reductasa y al unirse a ella inhibe la síntesis de tetrahidrofolatos necesarios para la síntesis de DNA, RNA y proteínas de la pared celular bacteriana (Molina, 2014).



**Figura 2.** Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción (Brock, 2009)

#### 2.4.6 Ampicilina

La ampicilina es una penicilina semisintética de amplio espectro con acción bactericida que actúa a nivel de la pared celular de las bacterias. Esto se debe a su efecto inhibitorio de la síntesis de la pared celular de la bacteria en sus últimas dos etapas, uniéndose a las PBP's (proteínas fijadoras de penicilinas), lo que lleva a la destrucción de la pared y la consiguiente lisis celular.

Es usualmente activa en contra de los siguientes microorganismos, tanto *in vitro*, como en infecciones clínicas; *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Shigella*, *Escherichia coli*, algunas cepas de *Klebsiella* y *Streptococcus* (PLM, 2005)

#### 2.4.7 Cefotaxima

Es un antibiótico bactericida de amplio espectro, semisintético, de la familia de los  $\beta$ -láctamicos y del grupo de las cefalosporinas de tercera generación que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana.

La cefotaxima es usualmente activa en contra de los siguientes microorganismos, tanto *in vitro*, como en infecciones clínicas: *Staphylococcus aureus* (incluyendo cepas resistentes a las ampicilinas), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B), *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella spp*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Acinetobacter spp* y contra ciertas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha demostrado que la cefotaxima es un potente inhibidor de las betalactamasas producidas por cierto tipo de bacterias Gram negativas (PLM, 2005).

#### **2.4.8 Pruebas de sensibilidad bacteriana a los antibióticos**

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Dentro de los beneficios que presenta se encuentran:

- ❖ Dirigir la terapéutica una vez que el microorganismo es conocido.
- ❖ Generar una base de datos que permita seleccionar los antibióticos a utilizar en un tratamiento empírico (aquel en que no conocemos el agente causal).
- ❖ Desarrollar políticas de uso de antibióticos.
- ❖ Vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.
- ❖ Detectar precozmente la diseminación epidémica de una cepa, tanto a nivel hospitalario como comunitario (Taroco, 2006).

Las pruebas de sensibilidad se clasifican en:

#### **Pruebas cuantitativas**

*Antibiograma por dilución:* Permiten cuantificar hasta qué grado un microorganismo es sensible a la acción de un antibiótico. Puede realizarse en medio líquido o sólido. Permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). (Basualdo, 1996).

La actividad antibacteriana exige una normalización o cuantificación, que se consigue mediante los métodos utilizados *in vitro* para comprobar la susceptibilidad de microorganismo en relación con el antibiótico. Con estos métodos se define:

- La concentración mínima inhibitoria (CMI). Se define como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es

capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de microorganismo). (Ferraro, 2000).

- La concentración mínima bactericida (CMB). Se define como la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* de una población bacteriana previamente estandarizada. (Ferraro, 2000).

### **Pruebas cualitativas**

*Antibiograma por difusión:* Hay distintas técnicas, la de mayor utilización es el método de Kirby- Bauer, que consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Luego de haber incubado las placas a la temperatura y tiempo adecuados, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Taroco, 2006).

### **Medios de cultivo para realizar las pruebas.**

De los medios disponibles se considera que tanto el agar como el caldo Mueller Hinton son los más apropiados para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, son baratos, contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, son adecuados para la mayoría de las bacterias patógenas en lo que a requerimientos nutricionales se refiere y existen suficientes datos recopilados que avalan su uso en las pruebas de sensibilidad (Taroco,2006).

#### **2.4.9 Uso de antibióticos en animales para consumo humano**

Según datos de la OMS, la mitad de la producción mundial de antibióticos se destina al uso veterinario para el tratamiento de animales enfermos, como promotores de crecimiento del ganado o para eliminar organismos destructores de productos agrarios.

Los antibióticos se incluyen dentro del amplio grupo de compuestos que forman parte de la composición de un pienso animal, pudiendo actuar con dos fines claramente diferenciados.

- Como terapéuticos y/o profilácticos, ya que los piensos constituyen una de las vías de administración más usadas para suministrar los fármacos en el sector veterinario. Los antibióticos se incorporan a los piensos en forma de premezclas medicamentosas (sólidas o líquidas) a concentraciones relativamente elevadas.
- Como promotores de crecimiento, favoreciéndose de esa forma el control de la flora bacteriana del animal, lo que se traduce en un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable de peso. En este caso, se incorpora el pienso en forma de aditivo y a concentraciones subterapéuticas.

En los últimos años, el uso veterinario de antibióticos, especialmente los empleados como promotores de crecimiento animal, está siendo objeto de duras críticas y presiones legales. La razón se debe a que, al parecer, estos agentes podrían ser los causantes directos del incremento de casos de resistencia a los medicamentos antimicrobianos administrados en la medicina humana. Por un lado, los alimentos procedentes de animales tratados terapéuticamente con agentes antimicrobianos pueden contener trazas de éstos que se incorporan al organismo humano a través de la cadena alimentaria, fomentando igualmente la



aparición de microorganismos resistentes en el hombre. Por otro lado, el consumo continuado de antibióticos promotores de crecimiento, aún a concentraciones subterapéuticas, fomenta la aparición en los animales de cepas de microorganismos resistentes que por diferentes vías de transmisión, especialmente a través de la cadena alimenticia, pueden llegar al ser humano (Cancho, 2000).

La Organización Mundial de la Salud advierte que entre las consecuencias adversas del uso de antibióticos en animales para consumo humano destacan las siguientes (Organización Mundial de la Salud ,1997):

- ❖ Un incremento en la prevalencia de bacterias resistentes en animales; lo que puede llevar a la transferencia de patógenos a los humanos ya sea por contacto directo o por el consumo de alimentos contaminados.
- ❖ La transferencia de genes de resistencia a las bacterias presentes en el humano.
- ❖ Un incremento en la incidencia de infecciones humanas causadas por patógenos.
- ❖ Potenciales problemas en el tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales.

#### **2.4.10 El microbioma humano y los antibióticos**

Los antibióticos se usan para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, tanto en las personas como en los animales. No obstante, los antibióticos también tienen un efecto secundario, no deseado, ya que actúan ejerciendo una presión selectiva sobre las bacterias que componen la compleja microbiota de las personas, favoreciendo la selección de bacterias resistentes.

Los seres humanos están constituidos no sólo por sus propias células, sino también por una gran cantidad de microorganismos (en gran medida bacterias) que nos acompañan, e interaccionan con nuestras células, siendo necesarios para el adecuado equilibrio y estado de salud de los individuos. A este conjunto de microorganismos que forma parte del organismo humano, las comunidades microbianas que constituyen y los genomas que albergan, se le ha denominado recientemente el microbioma (Baquero, 2012).

Cuando nacemos, nuestro organismo está libre de bacterias pero rápidamente nos vemos expuestos a una gran diversidad de microorganismos procedentes de nuestra propia madre, de otros individuos, de los alimentos o del ambiente. Se va produciendo la colonización de ciertas áreas del organismo: primero, de una manera transitoria y, posteriormente, de forma más estable, mediante el establecimiento de comunidades microbianas complejas y específicas de cada localización. Las áreas de nuestro organismo más densamente pobladas y que presentan las comunidades microbianas más complejas son el colon y la cavidad oral (Torres, 2012).

Por último, es importante señalar que con frecuencia, las infecciones son causadas por las propias bacterias del microbioma humano y, por tanto, cuanto más elevada sea la tasa de resistencia a los antibióticos del mismo, mayores problemas se pueden derivar para el tratamiento de dichas infecciones (Torres, 2012).

## **2.5 RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS**

La resistencia bacteriana es la capacidad que tiene la bacteria de sobrevivir en presencia de un antibiótico y representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación, ya sea en nosocomios o el ambiente general. Esto reduce las opciones terapéuticas, lo que repercute directamente en el éxito de la terapia antimicrobiana para combatir las infecciones secundarias producidas por estos patógenos, además de provocar elevados índices de morbilidad, mortalidad y costos hospitalarios (Garza, 2008).

La resistencia se describe como la relativa ausencia de susceptibilidad de un microorganismo a un tratamiento particular en ciertas condiciones (Cabrera, 2008).

Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico cuando el antibiótico es eficaz frente a ella y podemos esperar la curación de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección (García, 1997).

Las cepas resistentes se hacen predominantes por la presión selectiva de los antibióticos que hacen desaparecer a las bacterias sensibles, no estando implicados solamente los antibióticos utilizados en medicina, sino también y de forma muy importante los empleados en veterinaria (Holmberg, 1987).

Debemos considerar la importancia que tienen en la práctica diaria los distintos tipos y mecanismos de resistencia que presentan las bacterias frente a los antimicrobianos disponibles, y tenerlos en cuenta a la hora de instaurar un tratamiento antibacteriano, ya que es sabido que las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y coste que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie (Holmberg, 1987).

Desde el inicio mismo de la era antibiótica (aparición de la penicilina) se ha descrito el fenómeno de la resistencia; se destaca en los años sesenta la aparición de la resistencia a la meticilina y posteriormente diversos mecanismos de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, neumococo resistente a la penicilina) y a vancomicina (*Enterococcus* vancomicino resistente, *Staphylococcus aureus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina) y la descripción de los diversos mecanismos de resistencia a las quinolonas dentro de los que se destacan los mecanismos de eflujo (Sussmann, 2001).

La causa de la resistencia a antibióticos es natural cuando las propias bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar las sustancias antibióticas producidas como elemento de defensa o estrategia competitiva con otros microorganismos (Martínez 2009). Pero esta resistencia o estrategia adaptativa de las bacterias está potenciada por la actividad humana con el uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas y animales. En este caso, el mecanismo selectivo impuesto por el hombre al aumentar la probabilidad de contacto de los antibióticos con las bacterias, ha provocado una rápida selección de las poblaciones bacterianas, favoreciendo a aquellas resistentes. Aunque la resistencia a antibióticos puede aparecer en ausencia de antibiótico por mutación genética, ha sido el uso excesivo de antibióticos el que ha provocado un incremento alarmante de resistencias que incluso ha llevado a adoptar medidas legales restringiendo su libre adquisición (Kümmerer 2004).

### 2.5.1 Tipos de resistencia bacteriana

- **Resistencia intrínseca (natural).** Esta resistencia es la que presentan, por ejemplo, los microorganismos productores de antibióticos como autodefensa frente a su efecto inhibitor. Se incluye, además, la resistencia de los microorganismos “insensibles” a los que no afectan determinados antibióticos, sin que con ello conlleve ningún tipo de alteración. La ausencia del blanco molecular de acción es una clara forma de resistencia intrínseca (Cordiés, 1998).
- **Resistencia adquirida.** La resistencia adquirida, como su nombre lo indica, se adquiere en un determinado momento del ciclo de vida del organismo. Puede adquirirse por mutación cromosómica o estar mediada por fenómenos de transferencia y adquisición genética (conjugación, transformación, transducción). Una vez que se adquiere la información genética, las bacterias pueden transmitir los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos) por los diversos procesos de intercambio de material genético (Cordiés, 1998).

### 2.6 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos para intercambiar genes de resistencia; estos no se producen exclusivamente entre poblaciones bacterianas de la misma especie, sino que también se han identificado entre especies diferentes, lo que explica parcialmente el aumento de la resistencia a los antibióticos.

El intercambio de genes implica la participación de elementos genéticos de transferencia o unidades de captura de genes entre los que se incluyen los plásmidos, los integrones y los transposones. (Ausina-Ruíz, 2005).

Estos genes generalmente están dirigidos contra una familia o tipo de antibióticos, aunque varios grupos de genes pueden acumularse en un mismo microorganismo y volverlo multirresistente (Ausina-Ruiz, 2005).

### **2.6.1 Plásmidos**

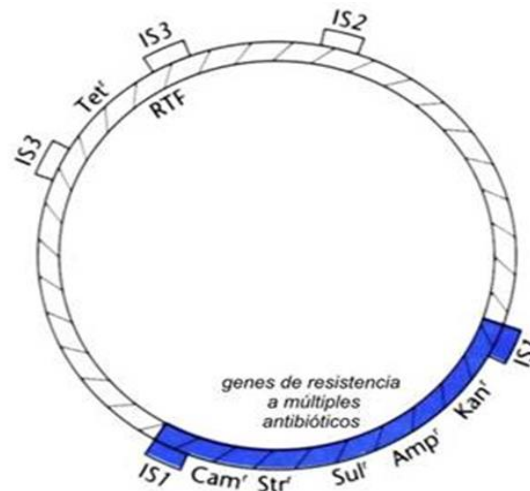
Los plásmidos son moléculas extracromosomales que generalmente tienen menos de un veinteavo del tamaño del cromosoma bacteriano; con frecuencia se les aísla en forma de un círculo cerrado y en menor proporción en forma lineal; al igual que el cromosoma, poseen doble cadena de ADN superenrollado, pero sin proteínas asociadas. Tienen replicación independiente del cromosoma bacteriano, motivo por el cual también se les conoce con el nombre de replicones (Sánchez, 2012).

El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia de este hasta algunos cientos por célula. En la mayoría de los casos se considera que no son moléculas esenciales para la existencia de la bacteria; sin embargo, pueden poseer información genética importante para ellas; por ejemplo, los genes que codifican las proteínas que las hacen resistentes a los antibióticos.

Se han identificado diferentes tipos de plásmidos, entre los cuales se encuentran los integrativos, que tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano, rompiéndolo momentáneamente y situándose en su interior, quedando automáticamente su replicación bajo el control de los cromosomas bacterianos.

Otro tipo de plásmidos son los conjugativos o sexuales, los cuales portan genes que codifican pilis (proyecciones citoplasmáticas) en la superficie de la bacteria, y cuya función es la transferencia de los plásmidos de célula a célula (Sánchez, 2012).

Los plásmidos están presentes normalmente en gran cantidad de bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. En general codifican características que mejoran los rasgos de supervivencia de las bacterias, sin ser imprescindibles para la misma. Pueden ser transferidos ente bacterias del mismo, o diferentes géneros (Errecalde, 2004).



**Figura 5.** Representación esquemática de un plásmido (Sánchez, 2006).

### 2.6.2. Transposones

Es una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula. Cada uno lleva uno o más genes que especifican las actividades enzimáticas requeridas para su propia transposición (Lewin, 1996).

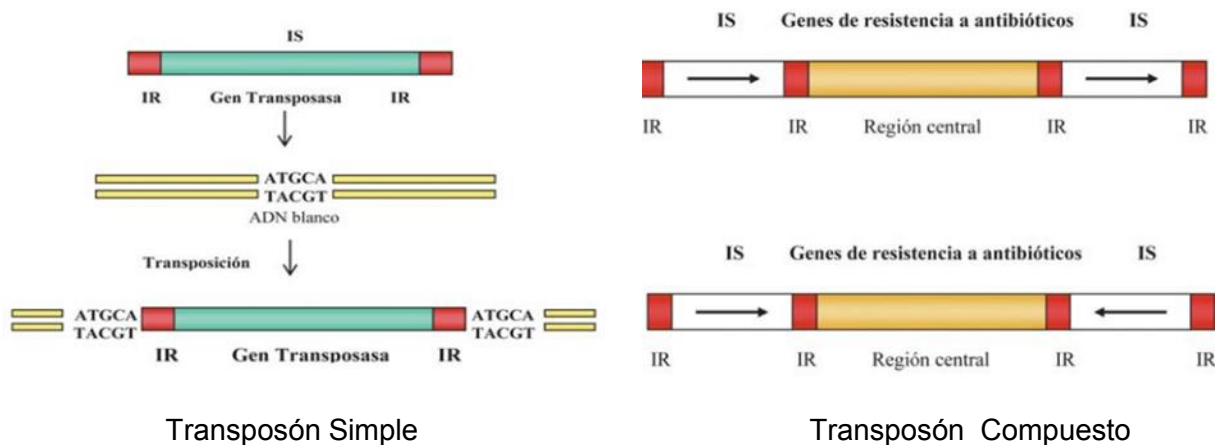
Se conocen dos tipos de transposones:

- *Transposón simple, secuencia de inserción o elemento de inserción (IS):* los transposones simples contiene una secuencia central con información para la transposasa y en los extremos una secuencia repetida en orden inverso. Cuando un transposón simple se integra en un determinado punto del ADN aparece una repetición directa de la secuencia diana (Galun, 2003).

- Transposón compuesto: Contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo en orden directo o inverso y una región central que además suele contener información de otro tipo. Por ejemplo, los factores de transferencia de resistencia (RTF), que poseen información en la zona central para resistencia a antibióticos (Galun, 2003).

Ejemplos de estos transposones compuestos son el Tn9, que porta genes de resistencia para cloranfenicol, el Tn10 para la tetraciclina y el Tn903 y Tn5 para la kanamicina (Brock, 2009). Estos transposones también pueden provocar mutaciones, ya que pueden moverse de un lugar a otro en el cromosoma, entre cromosomas, de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos; por esto fueron llamados “genes saltarines”. (Curtis, 2006).

Un rasgo central y peligroso de los transposones es la posibilidad de que varios de ellos, codificando resistencias a múltiples fármacos, estén incluidos dentro de un mismo plásmido, lo que permite, por transferencia de este último, la adquisición de multirresistencia por parte de la bacteria receptora (Errecalde, 2004).



**Figura 6.** Representación esquemática de un Transposón simple y un Transposón compuesto (Orman, 2006).

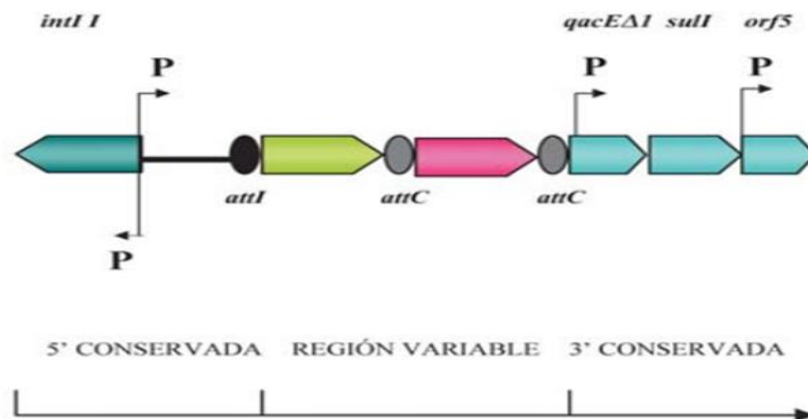


### 2.6.3 Integrones y *cassettes* genéticos

Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico, en el que por un mecanismo de recombinación sitio-específica se acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón. Los genes estructurales presentes en los integrones conocidos son mayoritariamente, genes de resistencia a antibióticos. El dinamismo de los integrones se refiere a la capacidad de los genes estructurales presentes en el integrón para escindirse en forma de círculos de ADN autónomos (llamados *cassettes* de genes) y a la capacidad de estos círculos autónomos para integrarse en un integrón diferente (García, 1999).

Todos los integrones conocidos están compuestos por tres elementos clave, necesarios para la obtención de genes exógenos: primero, un gen que codifica para una integrasa (*intI*), segundo, un sitio primario de recombinación (*attI*) y tercero, un promotor fuerte (*P*) (Rowe-Magnus, 1999).

Los *cassettes* genéticos codifican resistencia para una amplia gama de compuestos antibacterianos, que incluyen antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y, según informaciones recientes, a quinolonas. Los elementos anteriores son necesarios para la transferencia de la resistencia bacteriana (Carattoli, 2009).



**Figura 7.** Representación esquemática de un integrón clase 1 (Orman, 2006).

## **2.7 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES EN BACTERIAS**

Un medio por el que las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos es por la transferencia horizontal de genes resistentes a los antibióticos (Gómez, 1998).

Una bacteria puede adquirir material genético por medio de alguno de los tres mecanismos de transferencia horizontal de genes conocidos: transformación, transducción y conjugación.

### **2.7.1 Transformación**

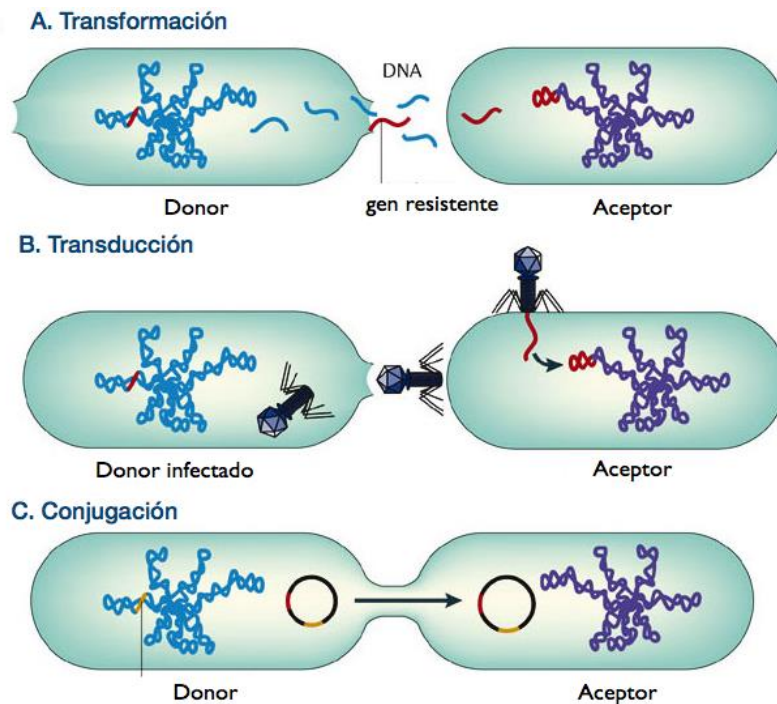
Es un proceso mediante el cual el ADN libre se incorpora a la célula receptora y provoca un cambio genético. Se dice que una célula capaz de adquirir una molécula de ADN y transformarse, es competente. Sólo ciertas cepas bacterianas en la naturaleza son competentes; por lo que, parece, es el mecanismo menos común de transferencia de la resistencia (Sánchez, 2012). Como en las bacterias el ADN está presente en la célula en forma de una sola molécula cromosómica larga, cuando la célula es lisada, el material genético sale. Debido a su gran longitud, los cromosomas bacterianos se rompen con facilidad dando lugar a fragmentos de un tamaño transferible de alrededor de 10kpb. Normalmente, una célula individual incorpora sólo uno o unos pocos de estos fragmentos (Brock, 2009).

### **2.7.2 Transducción**

Algunos virus bacterianos (bacteriófagos) pueden transferir a una bacteria segmentos génicos de resistencia de otra bacteria cuando empaqueta por equivocación parte de estos segmentos y al infectar nuevamente incluye los segmentos bacterianos que pueden intercambiarse con el de la bacteria infectada y volverla resistente (Tenover, 2006).

### 2.7.3 Conjugación

Es la transferencia de material genético entre bacterias por contacto directo célula a célula, mediante puentes de unión y conexión entre las dos (Dubnau, 1991). Una célula donante transmite información genética a otra célula receptora, pero debe ocurrir un contacto específico entre estas dos células. La célula donante, en virtud de que contiene un plásmido conjugativo, posee una estructura en la superficie, denominada pelo sexual, que se retrae y forma el puente entre las dos bacterias; por este puente pasa el ADN de una de las células a la otra. Se ha demostrado experimentalmente que el círculo de ADN del plásmido se abre y una cadena sencilla del plásmido es transferida y posteriormente replicada en la célula receptora; al final, los genes del plásmido se encuentran tanto en la bacteria donante como en la receptora. Los plásmidos conjugativos se pueden diseminar rápidamente entre poblaciones; esta característica los convierte en los principales elementos que intervienen en la transferencia de la resistencia bacteriana. (Sánchez, 2012).



**Figura 8.** Mecanismos de transferencia genética horizontal (Furuya, 2006).

## **2.8 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

Las bacterias son resistentes a los antibióticos debido a la expresión de diferentes mecanismos de resistencia. Según sean el grupo del antibiótico y la especie bacteriana, estos mecanismos se pueden agrupar en cuatro: a) inactivación o modificación del antibiótico; b) modificación del sitio blanco de la bacteria debido a mutaciones espontáneas ocurridas en los genes que codifican al blanco de acción del antibiótico; c) modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana; y d) expulsión del antibiótico debido a la sobre-expresión de bombas de eflujo. (Garza, 2008).

### **2.8.1 Inactivación y/o modificación del antibiótico**

Muchas bacterias son capaces de sintetizar enzimas que modifican de forma específica e irreversible a los antibióticos. Esta acción puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: la enzima puede inactivar el antibiótico como consecuencia de la ruptura de enlaces covalentes de su estructura, o modificarlo químicamente por adición o sustitución de radicales de su molécula. La destrucción enzimática es uno de los mecanismos de resistencia más frecuente a los  $\beta$ -láctamicos. Se conoce un gran número de  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -láctamico de penicilinas y cefalosporinas, originando derivados biológicamente inactivos.

Entre los mecanismos de inactivación por sustitución o modificación del antibiótico, podemos mencionar la resistencia al cloranfenicol en la que la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa acetila los grupos hidroxilos del mismo. De igual forma, las enzimas adenil-transferasas (AMP), fosforil-transferasas ( $-\text{PO}_3$ ) o acetil-transferasas modifican los aminoglicósidos de manera que reducen o pierden su afinidad por el ribosoma (Shaw, 1993).

Las  $\beta$ -lactamasas son las enzimas que más se han estudiado ya que constituyen uno de los mecanismos más utilizados por las bacterias para evadir la acción de los antibióticos.

Sabemos que los antibióticos,  $\beta$ -lactámicos como penicilina, oxacilina, cefalosporinas, actúan inhibiendo la enzima D-alanil D-alanin carboxipeptidasa (PBPs) encargada de la síntesis de la pared. La  $\beta$ -lactamasa hidroliza el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo (Sussmann, 2001).

Las  $\beta$ -lactamasas de bacterias Gram positivas son plasmídicas, inducibles y excretadas extracelularmente, mientras que las de bacterias Gram negativas son de origen plasmídico o por transposones, constitutivas e intracelulares, lo que permite a estas últimas bacterias una mayor resistencia a antibióticos por este mecanismo, ya que no salen de la célula.

En el caso de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos codificadas por plásmidos, las principales enzimas responsables de catalizar la modificación, están la acetil-transferasa (AAC), fosoril-transferasa y adenil-transferasa (ANT o AAD). Cuando un aminoglucósido es inactivado ya no puede unirse a la subunidad 30S ribosomal y por lo tanto no pueden interferir en la síntesis de proteínas (Gerard, 2006).

El mecanismo de resistencia a eritromicina es común a lincosamidas y estreptograminas (grupo MLS). La producción de eritromicina esterasas, cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Se han descrito estearasa I y II confinadas a Gram negativos (Gerard, 2006).

La modificación del cloranfenicol la realiza una enzima intracelular, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), existente tanto en Gram positivos como en Gram negativos. Esta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S (Levi, 1998).

### 2.8.2 Alteración del sitio donde los antibióticos ejercen su acción

La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras. Por ejemplo, la modificación por mutación de los genes *GyrA* y *GyrB* que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofrecen resistencia bacteriana a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* frente a las quinolonas (Pérez,2013).

En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal podemos mencionar los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas. Por ejemplo, la metilación del RNA ribosomal de la subunidad 50S confiere resistencia a *S. aureus* y *S. epidermidis* frente a tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. La resistencia bacteriana contra gentamicina, tobramicina y amikacina consiste en una modificación de la subunidad ribosomal 30S (Pérez, 2013).

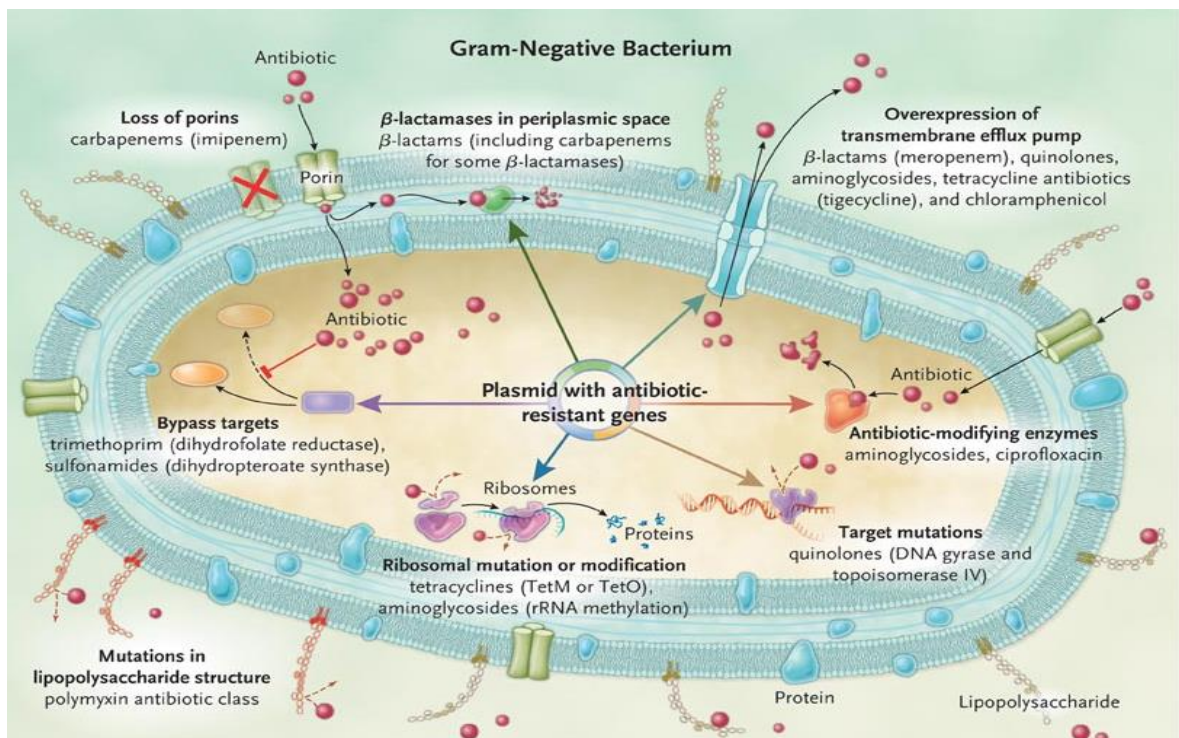
Una alteración en el blanco del antibiótico impide la unión del antimicrobiano y, consecuentemente, confiere resistencia al mismo. Encontramos este mecanismo de resistencia en aquellas modificaciones estructurales que afectan a las proteínas de unión a penicilina (PBPs) presentes en la pared bacteriana de algunas cepas resistentes a este antibiótico. Las alteraciones de las PBPs son adquiridas y casi siempre se deben a mutaciones cromosómicas (Wright, 2005).

Este mecanismo es utilizado principalmente por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos a nivel de proteínas que unen penicilinas (Cordiés, 1998).

### 2.8.3 Modificación de la permeabilidad de la membrana

La mayoría de los antibióticos necesitan penetrar la barrera interpuesta por la membrana celular para poder ejercer su acción en el interior de la célula. En el caso de las bacterias Gram negativas que presentan, además de la membrana celular, el peptidoglicano y una membrana externa con proteínas denominadas porinas que actúan como canales acuosos y proveen una ruta hidrofílica a través de la membrana hasta el espacio periplásmico de sustancias químicas, entre ellas muchos antibióticos, se ha observado que presentan mayor resistencia en comparación con las bacterias Gram positivas.

*Pseudomonas aeruginosa* presenta una resistencia intrínseca a muchos antibióticos debido a la poca cantidad de estas porinas; también las mutaciones genéticas pueden conllevar la alteración en la forma o en el número existente y llevar así a la resistencia (Cabrera, 2006).



**Figura 9.** Mecanismos que poseen las bacterias para resistir a los antibióticos (Peleg, 2010).

## 2.9 BOMBAS DE EXPULSIÓN

El “eflujo” en una célula, es el bombeo de un soluto fuera de la misma. Los genes que codifican para las “bombas de eflujo” o “bombas de expulsión” se encuentran en todos los organismos, tanto en bacterias susceptibles como en bacterias resistentes a antibióticos. En las bacterias, estos genes se pueden encontrar en el cromosoma o en elementos genéticos transmisibles. Algunos de estos sistemas pueden ser inducidos por sus propios sustratos, de modo que una cepa que es aparentemente susceptible podría ser capaz de sobre-producir una bomba de expulsión y adquirir resistencia (Piddock, 2006).

Las bombas de expulsión son proteínas transportadoras implicadas en la extrusión de compuestos tóxicos (incluidas todas las clases de antibióticos clínicamente relevantes) del interior al exterior celular. Estas proteínas se encuentran tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas, así como en organismos eucariotas. En las células existen sistemas generales de detoxificación, como los sistemas de resistencia múltiple a fármacos (*Multi-Drug Resistance*), capaces de expulsar numerosos sustratos tóxicos. Los sistemas generales MDR están presentes en todos los seres vivos y son capaces de expulsar numerosos compuestos citotóxicos no relacionados estructuralmente, incluyendo diversos antibióticos (Van Banbeke, 2000).

El principal papel de este mecanismo es mantener bajas o nulas concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula (Gottesman, 1993). Expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de componentes tóxicos, entre ellos metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos (Zechini, 2009).

Una amplia variedad de bombas de eflujo proveen resistencia antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembranales. En el caso de las bacterias Gram negativas involucra también componentes en la membrana



externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra. Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario utilizado para la limpieza de superficies (Pérez-Cano, 2013).

Estos transportadores se describieron por primera vez en células eucarióticas: la glicoproteína P que confería resistencia a medicamentos anticancerígenos mediante su expulsión por transporte activo acoplado a hidrólisis de ATP (Thomson, 2000).

Los genes que codifican a los distintos componentes de estas bombas de expulsión se encuentran en el cromosoma bacteriano, generalmente en forma de operones (Piddock, 2006).

Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato, o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicamente diferentes, incluyendo antimicrobianos de múltiples clases (de allí el término *Multiple Drug Resistance*: MDR). En este último caso las bombas pueden estar asociadas con múltiple resistencia antimicrobiana (Marchetti, 2011).

La medición de la acumulación de antibióticos y la contribución de la actividad de eflujo ha demostrado ser importante para la comprensión de los mecanismos de resistencia a muchos antibióticos y de cómo las bacterias pueden volverse multirresistentes. Las bombas de multirresistencia a fármacos a menudo tienen una amplia gama de sustratos, este hecho permite la detección de su actividad mediante la medición de la acumulación de sustratos como antibióticos o una gama de sustratos fluorescentes que pueden ser fácilmente utilizados como marcadores de actividad de eflujo (Webber & Coldham, 2010).

Los sistemas de expulsión multidroga se han convertido en mecanismos de resistencia relevantes en bacterias patógenas. A diferencia de otros mecanismos de resistencia adquiridos por bacterias virulentas a través de transferencia genética horizontal, los genes que codifican a las bombas de expulsión están presentes en el cromosoma de todos los organismos vivos. La mayoría de estos genes se encuentran en el cromosoma bacteriano y tienen una disposición y estructura conservada, así como unos niveles de expresión regulados de forma estricta (Grkovic, 2002).

Además de la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal, es posible que la resistencia a los antibióticos que se utilizan en medicina humana y veterinaria sea un proceso mediado por bombas de expulsión como subproducto de la función fisiológica de estas bombas que, en un medio de estrés (generado por una presión selectiva constante), su sobre-expresión puede ser benéfica para la supervivencia de algunas bacterias. (Piddock, 2004).

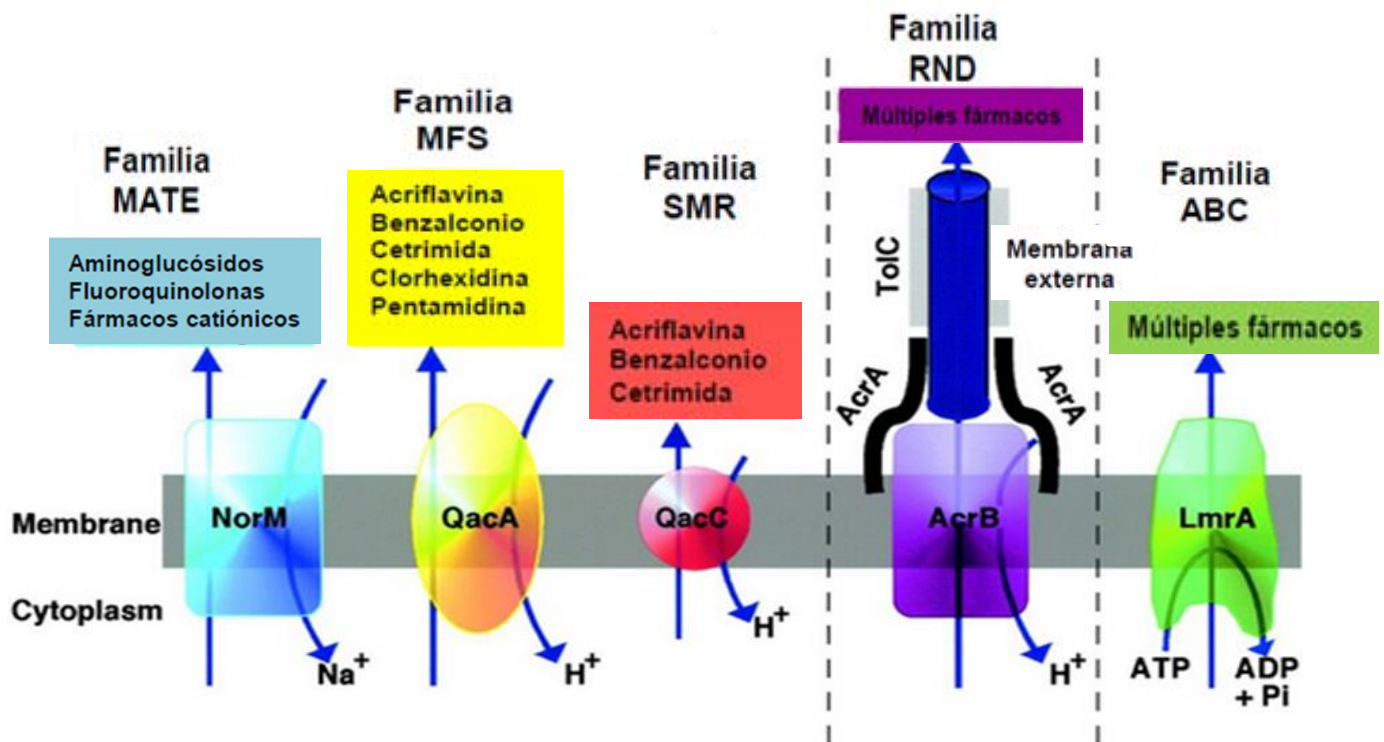
### **2.9.1 Familias de bombas de expulsión**

Las bombas de expulsión corresponden a una clase de transportadores involucrados en la captación de nutrientes esenciales e iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente y se encuentran clasificados en cinco grandes familias (Nikaido, 2009).

Existen cinco familias de proteínas de bombas de expulsión: 1) Familia de *cassette* de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP binding cassette*); 2) Superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*); 3) familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, *multidrug and toxic-compound extrusion*) 4) familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, *small multidrug resistance*); y 5) familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*).

La expulsión por las proteínas de las familias RND, SMR y MFS es impulsada por una fuerza protón motriz; la expulsión por las proteínas de la familia MATE es impulsada por un sistema antiporte de sodio. Al transporte por medio de las proteínas de las familias mencionadas se le conoce como transporte secundario. Finalmente, la hidrólisis acoplada de ATP provoca la expulsión en los transportadores primarios de la familia ABC (Sánchez, 2003).

Los sistemas de eflujo están agrupados en familias de proteínas transportadoras basadas en la similitud de las secuencias de aminoácidos así como las similitudes en el tamaño y en las estructuras secundarias. Dos de estas familias: ABC y MFS, se encuentran distribuidas ubicuamente entre organismos procariotas y eucariotas. RND, SMR y MATE están descritas únicamente en procariotas (Lynch, 2006).



**Figura 10.** Representación esquemática de las diferentes familias de sistemas de expulsión activa (Pidcock, 2006).

### 2.9.1.1 Familia MFS

Estos transportadores están compuestos típicamente por aproximadamente 400 residuos de aminoácidos que se suponen arreglados en 12 hélice alfa intermembranales con un largo bucle citoplasmático entre los hélices 6 y 7. Un ejemplo típico de estos transportadores es NorA de *S. aureus* que produce resistencia a fluoroquinolonas, además de colorantes e inhibidores catiónicos como la puromicina y tetrafenilfosfonio (Nikaido, 2009).

Un pequeño número de los transportadores MFS tiene una topología de 14 hélices alfa; no obstante, los transportadores MFS de este tipo tienden a formar un bucle citoplasmático de menor tamaño (Borges-Walmsley, 2003). Los primeros ejemplos de esta clase fueron los transportadores QacA y QacB. Estas bombas expulsan sustancias biocidas y colorantes monocatiónicos como el cloruro de benzalconio, cetiltrimetilamonio y bromuro de etidio (Nikaido, 2009).

Los compuestos que son transportados por esta familia incluyen azúcares simples, oligosacáridos, inositoles, fármacos, aminoácidos, ésteres organofosforados, etc. (Yerushalmi, 1995).

Los transportadores MFS y los ABC son las dos familias de transportadores más grandes y más diversas desde el punto de vista funcional. Sin embargo, los transportadores MFS se diferencian de los ABC tanto en su secuencia y estructura como en la manera de obtener energía para realizar su función.

En bacterias Gram positivas clínicamente relevantes, las dos bombas de expulsión que han sido estudiadas con más detalle pertenecen a la familia MFS: NorA de *Staphylococcus aureus* y PmrA de *Streptococcus pneumoniae* (Yin, 2006).

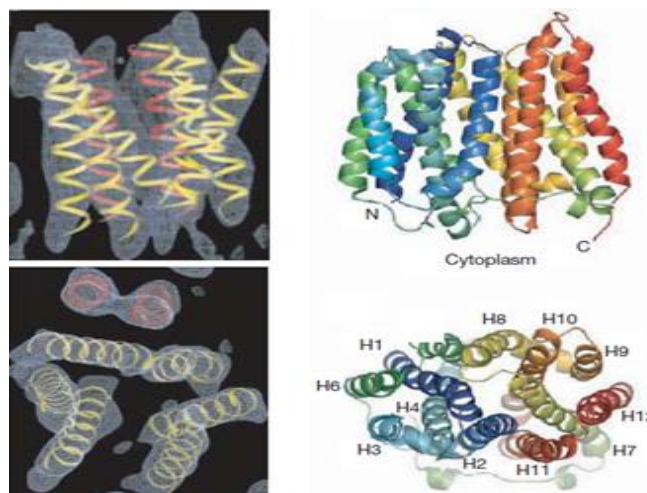
La familia MFS es conocida por representar el más amplio grupo de transportadores secundarios, como bombas de MDR bien caracterizadas, entre ellas, Bmr y Blt de *Bacillus subtilis*, MdfA de *E. coli*. (Nikaido, 2009).

### 2.9.1.2 Familia SMR

Las bombas de eflujo de la familia SMR fueron descubiertas en un plásmido perteneciente a *S. aureus*. Posteriormente, se encontraron también codificadas por genes en el cromosoma de bacterias Gram negativas (Lynch, 2006).

Actualmente se sabe que las proteínas SMR pueden ser codificadas en el cromosoma o plásmidos y también se les asocia con los integrones. La especificidad de sustrato no se limita a los desinfectantes y puede extenderse a los antibacterianos clínicamente relevantes, como los aminoglucósidos (Li & Nikaido, 2009).

Están normalmente compuestos de alrededor de 100 aminoácidos arreglados en cuatro hélices alfa transmembranales. Una de las bombas SMR mejor caracterizadas es Emr de *E. coli*, un transportador multifármacos que confiere resistencia al bromuro de etidio y al metil viologen. Otra bomba SMR multifármacos de *P. aeruginosa* muy cercana a la bomba EmrE ha sido recientemente caracterizada y se comprobó que tiene un papel importante en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* al bromuro de etidio, acriflavina y a antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (Borges- Walmsley, 2003).



### 2.9.1.3 Familia RND

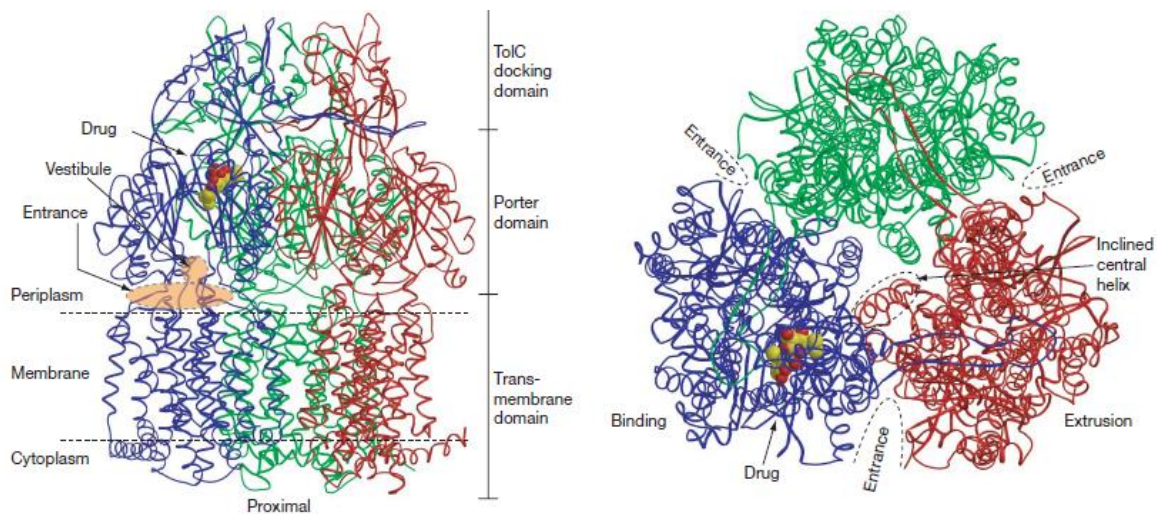
Estos transportadores son mucho más grandes que los de la familia MFS ya que están compuestos por lo general de aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos; se caracterizan por poseer 12 hélices alfa transmembranales (Nikaido, 2009). Sin embargo, a diferencia de los transportadores MFS, éstos poseen dos largos dominios extracitoplásmicos entre las hélices 1 y 2 y entre las hélices 7 y 8. Se ha demostrado que estos dominios tienen un papel importante en el reconocimiento de fármacos (Borges.Walmsley-2003).

Los transportadores pertenecientes a esta superfamilia juegan un papel muy importante en la multirresistencia en las bacterias Gram negativas. Esto es porque las bombas se asocian con otras dos clases de proteínas: una proteína perteneciente a la familia OMF (*Outer Membrane Factor*) que forma un conducto hacia la membrana externa (ejemplificando principalmente por TolC) y, una proteína que funciona como “adaptador” periplasmático, clasificada en la familia MFP (*Membrane Fusion Protein*), formando un complejo tripartito. Esta construcción permite el eflujo de los fármacos directamente hacia el medio externo, en lugar de mantenerse en el espacio periplasmático (Nikaido, 2009).

A ella pertenecen la mayoría de los transportadores MDR (sistemas de multirresistencia) de las bacterias Gram negativas: AcrB, AcrD, MdtB y MdtC de *E. coli*. (Sánchez, 2003).

Los sistemas tripartitos RND mejor caracterizados son: el sistema AcrAB-TolC de *Escherichia coli* y MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* (Li & Nikaido, 2009).

Los transportadores RND están especialmente disseminados entre las bacterias Gram negativas y juegan un papel importante en la resistencia intrínseca de estas bacterias al catalizar la expulsión activa de muchos antibióticos (Aires, 1999).



**Figura 12.** Representación esquemática de la estructura de un transportador RND (Huggins, 2007).

#### 2.9.1.4 Familia MATE.

Esta bomba utiliza el transporte de  $\text{Na}^+$  como sustrato energético (Zechini, 2009). Los transportadores MATE son similares en tamaño a los MFS, y se componen típicamente de aproximadamente 450 residuos de aminoácidos dispuestos en 12 hélices. Sin embargo, no tienen ninguna similitud de secuencia con los miembros de la superfamilia de MFS (Jack, 2001).

Las bombas de expulsión multidroga pertenecientes a la familia MATE han sido descritas en varias bacterias, como *Vibrio parahaemolyticus* (NorM), *Vibrio cholerae* (VcrM; VcmA), *Bacteroides thetaiotaomicron* (BexA), *Haemophilus influenzae* (HmrM), *Pseudomonas aeruginosa* (PmpM), *Clostridium difficile* (CdeA), y *S. aureus* (MepA). Estos transportadores son capaces de reconocer y expulsar algunos compuestos que son sustratos de transportadores RND. Sin embargo, difieren en la organización estructural, pues los transportadores MATE están formados por una proteína y los RND son un complejo de tres proteínas (Pidcock, 2006).

Otro transportador de la familia MATE, YdhE, ha sido caracterizado en *E. coli*, y se demostró que confiere resistencia a antimicrobianos catiónicos (como: ácido nalidixico, norfloxacina, ciprofloxacina, etc. (Sánchez, 2003).

Los transportadores MATE son una familia relativamente nueva de los transportadores de fármacos bacterianos y por tanto, de todas las familias de bombas de expulsión actualmente conocidas. Estos transportadores son los menos caracterizados. Se sabe poco sobre su estructura, regulación o mecanismo de acción (Borges-Walmsley, 2003).

Estos transportadores presentan perfiles de sustrato generalmente más estrechos que los de los transportadores RND. A la fecha, hay sólo unos 20 transportadores MATE caracterizados, aunque las secuencias de genomas bacterianos contienen muchos más ejemplos aun por caracterizar (Li & Nikaido, 2009).

### **2.9.1.5 Familia ABC**

Estas bombas utilizan como fuente de energía la hidrólisis de moléculas de ATP. Esta familia comprende dos clases de proteínas diferentes, las denominadas tipo procariota (*PK-type*) y las tipo eucariota (*EK-type*).

*PK-type* consiste de tres componentes: 1) dos proteínas integrales con seis segmentos transmembranales, 2) dos proteínas periféricas que capturan e hidrolizan ATP y, 3) una proteína periplásmica donde se une el sustrato.

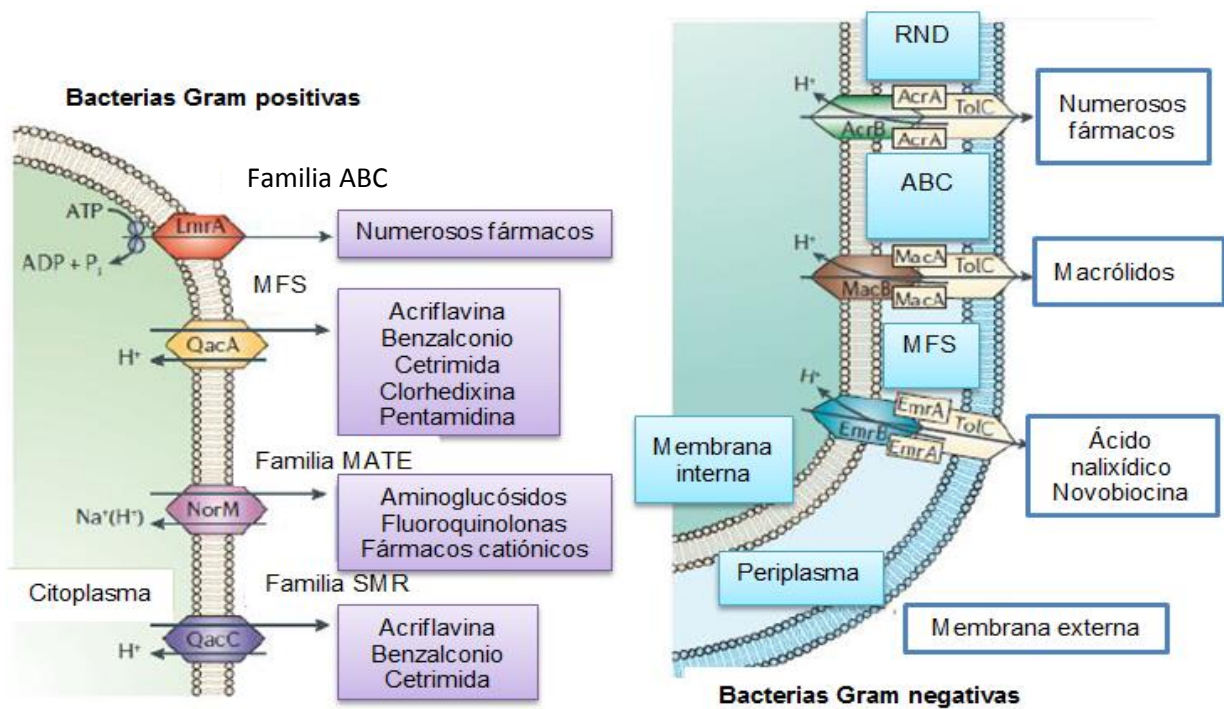
En las bacterias, estos transportadores poseen alta especificidad por el sustrato que incluye azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, complejos orgánicos de hierro, vitaminas y antimicrobianos (Machetti, 2011).

A esta familia pertenecen diversos transportadores de fármacos, azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, péptidos, etc. Son transportadores tipo ABC el



sistema MDR LmrA de *Lactococcus lactis* y su homólogo humano la glicoproteína P (Sánchez, 2003).

En contraste con los organismos procariotes, el principal mecanismo de expulsión en eucariotes es dependiente de proteínas que consiguen la energía para el transporte por medio de hidrólisis de ATP. Los miembros de esta familia incluyen a la bomba de resistencia multifármacos, P-gp (glicoproteína P) y MRP (proteína de resistencia multifármacos); ambas confieren resistencia a fármacos anticancerígenos. Dichos transportadores también se encuentran en numerosos hongos patogénicos y protozoarios, en donde confieren resistencia a antimicrobianos (Borges-Walmsley, 2003).

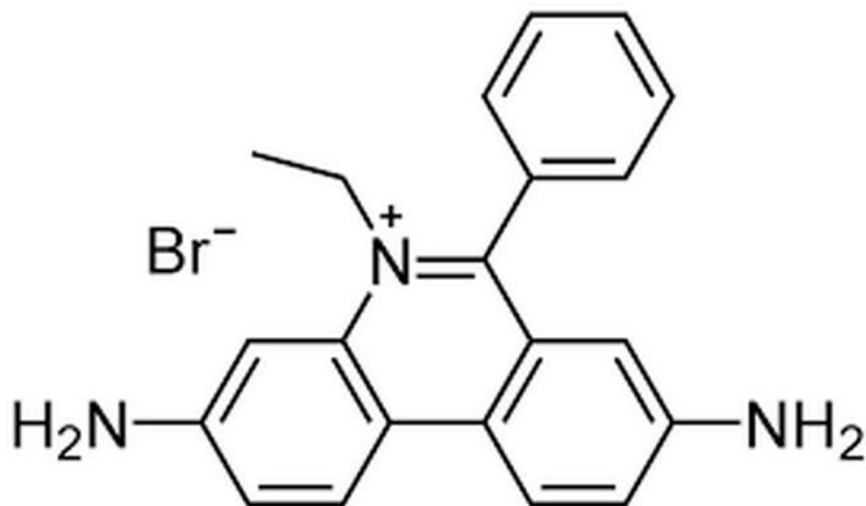


**Figura 13.** Estructura y localización en la membrana de las diferentes familias de bombas de expulsión. Se muestran algunos ejemplos de antibióticos que son sustrato para cada bomba en particular (Pidcock, 2006).

## 2.10 BROMURO DE ETIDIO

El bromuro de etidio está formado por cristales de color rojo oscuro; su nombre sistemático es bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenenetrinio o también llamado bromuro de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridinio. La mayor parte de la molécula es una estructura tricíclica con grupos aminobenceno en cada lado de una molécula piridínica (seis átomos, conteniendo nitrógeno y un anillo aromático). Esta estructura dibenzopiridínica es conocida con el nombre de fenantridina.

Es un agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando esta sustancia se expone a la luz ultravioleta emite una luz rojo-anaranjada que se intensifica luego de haberse unido a la cadena de ADN permitiendo así su visualización. Al intercalarse entre las bases del ADN tiene un poderoso efecto mutagénico lo que le confiere un potencial efecto cancerígeno y teratogénico siendo su efecto acumulativo (UPV, 2010).



**Figura 14.** Estructura química del Bromuro de Etidio (FEUM, 2011).

## 2.11 PREVENCIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA

En la actualidad existen varias estrategias con el fin de minimizar la resistencia de las bacterias a la acción de los antibióticos. A continuación se enumeran las que aparecen en la literatura revisada.

- ❖ Uso racional de los antibióticos mediante la educación a los médicos y la población. Incremento en los planes de educación médica del estudio de las enfermedades infecciosas, el uso de los agentes antimicrobianos y su prescripción basada en la evidencia.
- ❖ Establecimiento de programas de vigilancia para detectar la aparición de cepas resistentes y mejoramiento de la calidad de los métodos de susceptibilidad para guiar la terapéutica empírica contra los patógenos que producen las enfermedades infecciosas más comunes.
- ❖ Racionalización del empleo de los antibióticos en la medicina veterinaria para la producción de alimento.
- ❖ Rotación cíclica de antibióticos en las instituciones de salud para reducir la resistencia.
- ❖ Cumplimiento estricto de las medidas de prevención y control de la infección intrahospitalaria.
- ❖ Empleo cada vez más de las vacunaciones. En este sentido, en la actualidad se buscan nuevas opciones contra gérmenes de alta virulencia y multirresistencia, productor de procesos infecciosos graves en los seres humanos como el neumococo (Fernández, 2003).

## 2.12 MICROBIOMA DE LA CAVIDAD ORAL HUMANA

La cavidad oral constituye el primer segmento del aparato digestivo que comunica el mundo exterior con el esófago. Las diferentes condiciones que pueden imperar en esta cavidad, junto con los cambios constantes del estilo de vida y la edad en el hombre, configuran un ecosistema expuesto a constantes modificaciones y a una gran variedad de problemas microbiológicos debido a su naturaleza abierta y dinámica (Prieto-Prieto,2004).

Es una de las partes más complejas y heterogéneas del organismo en la que habitan más de 500 especies bacterianas, además de hongos y parásitos que cumplen una serie de funciones:

- Metabolizan restos nutritivos que pueden haber quedado en los nichos y,
- Constituyen un tapiz que dificulta la colonización por otros microorganismos externos, sobre todo a través de la formación de la biopelícula, estructura en la que permanecen coagregados los diferentes microorganismos en el seno de una matriz polimérica (Rodríguez-Alonso, 2009).

Es una de las zonas anatómicas de nuestro organismo con un alto número y variedad de bacterias. Estos microorganismos interaccionan tanto entre sí como con el medio oral estableciendo un complejo ecosistema dinámico donde se pueden encontrar de forma simultánea bacterias residentes y transeúntes ocasionales. La citada situación se refleja de forma peculiar en cada nicho ecológico (lengua, encía, surco gingival, etc.), en el que podemos apreciar especies bacterianas en proporciones diferentes. Así, por ejemplo, en el dorso de lengua, asociada con otras bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, predomina la especie *Streptococcus salivaris* y en el surco gingival predominan *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus oralis* (Maestre,2002).

No podemos hablar de la flora oral como un único ecosistema ya que los distintos tejidos y estructuras de la cavidad oral (superficie dental, surco gingival, mucosa bucal, dorso lingual y la saliva) dan lugar a la existencia de distintos ecosistemas o nichos; cada uno de ellos presenta características ecológicas específicas que condicionan la colonización por diferentes microorganismos (Liébana, 1998).

En la placa dental se diferencian dos regiones, la supragingival y la subgingival. En la primera, bañada por la saliva predominan los *Streptococcus* del grupo *viridans* (*mutans*, *sobrinus*, *sanguis*.) y secundariamente *Lactobacillus*; mientras que la región subgingival, los microorganismos presentes son fundamentalmente *Fusobacterium spp*, *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp* y *Peptoestreptococcus spp*. En la lengua y mucosa bucal, siendo los microorganismos más frecuentes los *Streptococcus* del grupo *viridans* (*S. salivarius*) y *Veillonella spp*. (Prieto-Prieto, 2004)

Cuando se alteran las condiciones de la cavidad oral, se producen cambios en la flora. Estos cambios pueden ser secundarios a modificaciones fisiológicas (edad, embarazo, composición salivar, etc.), del estilo de vida (hábitos higiénicos y dietéticos, tabaquismo, etc.), a intervención terapéutica (exodoncia, tratamiento antibiótico previo, etc.) o a la presencia de situaciones patológicas (estados de inmunosupresión, infección odontógena, hospitalización, etc.) (Rodríguez – Alonso, 2009).

La saliva contiene nutrientes microbianos, pero no es un buen medio de cultivo, puesto que dichos nutrientes sólo se hallan en concentraciones bajas y, por otra parte, la saliva contiene sustancias antibacterianas. Una de estas sustancias es la lisozima, una enzima que escinde los enlaces glicosídicos del peptidoglicano presente en la pared celular bacteriana, produciendo el debilitamiento de la pared y la lisis celular (Brock,2009).

Pese a la acción de esta sustancia antibacteriana, las partículas alimenticias y restos de células acumulados cerca de superficies tanto de los dientes como de las encías proporcionan altas concentraciones de nutrientes, creando condiciones favorables para el crecimiento microbiano, el daño tisular y las enfermedades (Brock,2009).

Las bacterias que habitan la cavidad oral no siempre producen infecciones (agudas o crónicas), sino que también se establecen en armonía con el huésped de manera más o menos permanente y componen la microbiota comensal. Algunos microorganismos pueden actuar como patógenos oportunistas al alcanzar el torrente circulatorio bajo una serie de circunstancias especiales, como podrían ser la extracción de piezas dentarias, la inserción de prótesis o, incluso, los tratamientos de limpieza bucal (Prieto - Prieto, 2004).

### **2.13 LA PLACA DENTAL: UN TIPO DE *BIOFILM***

Las bacterias que se encuentran en la saliva pueden ser consideradas como bacterias planctónicas (bacterias que flotan en una fase líquida). Sin embargo, las bacterias que se encuentran en una superficie dura (diente, reconstrucciones, prótesis e implantes) forman una película gelatinosa adherente: la placa dental. La placa dental es el principal agente etiológico de la caries y de las enfermedades periodontales (Fine, 1998).

En los años 90, gracias al desarrollo y perfeccionamiento del microscopio confocal de láser, se llegó a un mejor conocimiento de la placa dental y de su estructura, y se desarrolló el modelo de la placa dental como *biofilm* (Serrano-Granger, 2005).

Un *biofilm* es la forma de crecimiento más frecuente de las bacterias y se definió en un principio como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido. Posteriormente, Costerton definió el *biofilm* como: una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por

bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Donlan, 2002).

Ciertas bacterias muestran o tienen la capacidad de desarrollar estructuras de superficie que favorecen la adhesión de las mismas a una superficie sólida, tales como fimbrias. Así, colonizadores primarios como *Actinomyces naeslundii*, varias especies de estreptococos, como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus mitis*, muestran fimbrias en su superficie. Otros factores que favorecen la adhesión de las bacterias a una superficie son la capacidad que muestran algunas especies bacterianas para el movimiento, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, o la expresión de ciertas proteínas en su superficie celular, denominadas adhesinas (Serrano-Granger, 2005).

El *biofilm* está compuesto por bacterias, que representan un 15%- 20% del volumen, y una matriz o glicocálix, que representaría el 75% - 80%. Esta matriz está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, sales minerales y material celular (Socransky, 2003).

Los exopolisacáridos producidos por unas bacterias pueden actuar como fuente de nutrientes para otras bacterias y, de la misma forma, pueden atrapar otros nutrientes del medio y ofrecerlos a los distintos tipos bacterianos presentes en el biofilm, lo cual supone una ventaja para el desarrollo bacteriano. La composición química y la estructura terciaria de los exopolisacáridos determinan la capacidad de adhesión de los mismos lo que a su vez favorece la adhesión de las bacterias a las superficies (Serrano-Granger, 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si existen bacterias resistentes o multirresistentes a antibióticos en el microbioma oral de humanos adultos jóvenes asintomáticos.

#### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar bacterias cultivables a partir de encías y dientes de voluntarios humanos asintomáticos.
- Investigar si en las muestras anteriores existen bacterias resistentes o multirresistentes a diferentes tipos de antibióticos.
- En caso afirmativo, purificar a algunas de las bacterias resistentes y multirresistentes.
- Identificar a dichas bacterias mediante tinciones y pruebas bioquímicas.
- Determinar la posible participación de sistemas de transporte de expulsión en el fenotipo de resistencia a antibióticos.

### **4. HIPÓTESIS**

Existen bacterias cultivables resistentes o multirresistentes a antibióticos en el microbioma oral de humanos jóvenes asintomáticos.



## 5. METODOLOGÍA EMPLEADA



### 5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 5.1.1 TOMA DE MUESTRAS

Para la toma de muestras se utilizó material estéril (hisopos, caldo BHI, solución salina isotónica) en condiciones asépticas para lo cual se utilizaron guantes, cofia y cubrebocas.

Se recolectaron 22 muestras orales de 11 individuos asintomáticos, específicamente de dientes (incisivos superiores e inferiores) y encías, el procedimiento que se realizó para el muestreo de cada individuo fue el siguiente: se humedecieron dos hisopos estériles en solución salina isotónica y posteriormente se tomaron las dos muestras orales a cada individuo (1 de dientes, 1 de encías), después dichos hisopos se colocaron en sus tubos de ensayo

respectivamente rotulados de 13x100 con medio estéril, el cual fue caldo BHI, esto último con la finalidad de facilitar su crecimiento y así proseguir con las siguientes pruebas.

### **5.1.2 CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LAS MUESTRAS**

Las 22 muestras obtenidas anteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se prepararon tubos de ensaye de 13x100 con 3 mililitros de caldo BHI previamente esterilizado, posteriormente se resembraron 100 microlitros de cada muestra en su tubo correspondiente y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Después se llevó a cabo una caracterización inicial con la finalidad de seleccionar a las bacterias resistentes a antibióticos, para lo cual se prepararon tubos con caldo BHI más antibiótico. Para esto se eligieron 2 antibióticos (ampicilina y cefotaxima), utilizando la concentración mínima inhibitoria (32µg/mL para ambos antibióticos).

Posteriormente se tomaron 3 mlilitros del caldo BHI más antibiótico y se colocaron en tubos de ensaye de 13x100, ya que se ocuparon dos antibióticos diferentes en esta etapa, se utilizaron dos tubos de ensaye por muestra teniendo un total de 44 tubos, después se colocaron 100 microlitros de la muestra a cada tubo y se incubaron por 24 horas a 37°C.

### **5.1.3 SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Transcurrido el tiempo de incubación se observó si las muestras en el caldo BHI con antibiótico presentaban crecimiento evidente, (lo cual nos indicaba que eran resistentes a los antibióticos probados y de esta manera podían ser utilizadas en las pruebas posteriores). Seleccionadas las muestras útiles, se procedió a preparar las cajas Petri que contenían los medios de cultivo diferenciales MSA y McConkey cuyo objetivo consistió en aislar colonias puras; cada muestra se sembró por la técnica estriado en cuadrante radial y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Para corroborar que las colonias aisladas anteriormente se encontraban puras, se realizó una tinción diferencial (la tinción de Gram), la cual también nos permitió clasificar las bacterias purificadas en dos categorías: Gram positivas y Gram negativas.

Se pudo determinar que todas las colonias seleccionadas se encontraban puras y para concluir esta etapa se resembraron las cepas en caldo BHI más antibiótico por 24 horas a 37°C.

#### **5.1.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación y caracterización de las cepas obtenidas anteriormente. Para las cepas Gram positivas se realizaron las pruebas de la catalasa y coagulasa; en lo que respecta a las cepas Gram negativas se realizaron las pruebas de citrato de Simmons, sulfhídrico indol movilidad (SIM), oxidación-fermentación (OF), MIO, catalasa, oxidasa, reducción de nitratos, agar hierro de Kligler (KIA), rojo de metilo/ Voges Proskauer (RM/VP) y ureasa. Se incubaron los tubos a 37°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo se realizó la interpretación de los resultados de la pruebas.

Para corroborar la identificación de las cepas Gram negativas se utilizó un sistema automatizado de identificación bacteriana **Vitek**.

### 5.1.5 ANTIBIOGRAMA (MÉTODO DE KIRBY-BAUER)

Posteriormente a las cepas se les realizó un perfil de multirresistencia utilizando el método de Kirby-Bauer.

Cada una de las cepas con crecimiento previo de 24 horas y ajustadas a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  células/mL se sembraron en cajas con agar Mueller Hinton por la técnica extendido en placa utilizando una varilla de vidrio previamente esterilizada con alcohol y la flama del mechero, a continuación se extendió la muestra por toda la superficie del agar con la finalidad de no dejar espacios sin cubrir y se dejó secar el inóculo de tres a cinco minutos. Posteriormente se colocaron multidiscos de antibiótico correspondientes a bacterias Gram positivas o Gram negativas (dependiendo de la cepa), se sacaron de su recipiente con pinzas metálicas previamente esterilizadas en alcohol y los multidiscos se depositaron en la superficie del medio inoculado, realizando una ligera presión para que se quedaran adheridos al mismo.

Finalizado lo anterior, la placa preparada con el inóculo y los antibióticos se invirtió y se llevó a incubar durante 24 horas a 37°C.

Para concluir esta etapa se observaron las cajas para determinar si presentaban o no halos de inhibición de crecimiento que aparecen alrededor de los discos de papel. Se valora la efectividad de los mismos consultando la tabla correspondiente en la que, según el antibiótico, tenemos la capacidad de difusión en el medio y por tanto, la medida de halo que corresponderá a una bacteria sensible, moderadamente sensible/de sensibilidad intermedia, o resistente. Realizado lo anterior se registraron los resultados.

### 5.1.6 RÉPLICA EN PLACA (REPLICA PLATING)

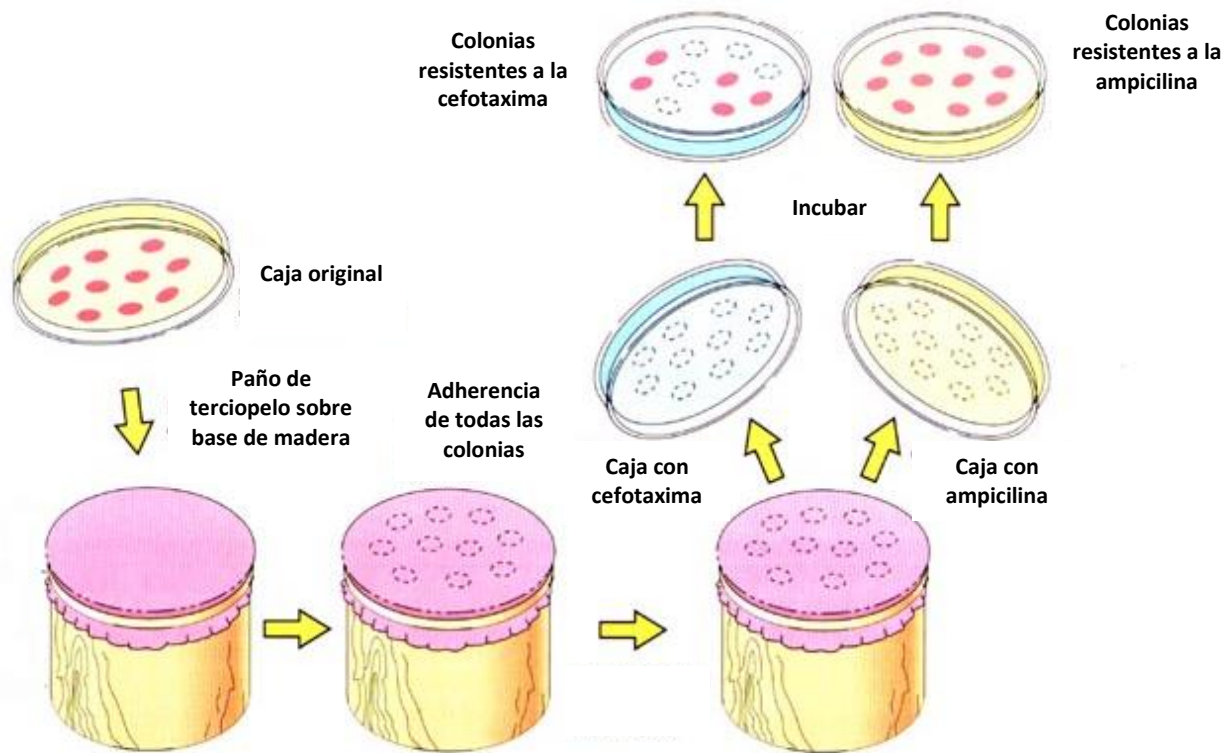
Para esta prueba se seleccionaron las cepas que presentaron multirresistencia en los antibiogramas (cabe mencionar que todas las cepas estudiadas presentaron multirresistencia). Se utilizaron las muestras originales (a partir de las cuales se obtuvieron las cepas en estudio).

Se tomó 1  $\mu$ L de la muestra original con crecimiento previo de 24 horas y se inoculó en 10 mL de solución salina isotónica estéril y se mezcló con la ayuda de un vórtex para después incubarse a temperatura ambiente.

Se prepararon cajas con medio Mueller Hinton, las cuales fueron inoculadas con su respectiva muestra por la técnica extendido en placa y se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se prepararon dos cajas con Mueller Hinton más antibiótico, una con el antibiótico ampicilina y otra con cefotaxima para cada muestra. Transcurrido el tiempo de incubación de las cajas sin antibiótico, se contaron las colonias de cada una de ellas. Cabe mencionar que para facilitar el conteo de las colonias cada caja se dividía en ocho partes y se procedía a contar un octavo de la caja para finalmente multiplicarlo por ocho.

A continuación se realizó un estudio porcentual de resistencia (replica plating) en condiciones asépticas, para cada cepa se utilizó un paño de terciopelo previamente esterilizado sujetado a una base de madera. La caja Petri que contenía las colonias previamente contadas, se invirtió sobre el paño de terciopelo presionando ligeramente, provocando que algunas células de las colonias originales quedaran adheridas a dicho paño. Luego se retiró la caja Petri (con medio Mueller Hinton) y se presionó la caja con ampicilina para volver a trasladar las células, pero esta vez del terciopelo a la caja con el antibiótico, esto último se repitió para el segundo antibiótico que se ocupó, cefotaxima.

Para finalizar esta etapa todas las cajas con antibióticos ya inoculadas se incubaron a 37°C por 24 horas, transcurrido el tiempo se contaron las colonias y se registraron los resultados.



**Figura 15.** Esquema sobre el procedimiento que se realizó en la técnica Replica Plating

### 5.1.7 PRUEBA DE BROMURO DE ETIDIO

Se determinó la posible sobreexpresión de las bombas de expulsión en todas las cepas. Para ello, cada cepa de 24 horas de crecimiento se inoculó en un tubo de ensayo a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL en caldo BHI más los volúmenes necesarios en cada caso para obtener concentraciones de 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 60  $\mu\text{g/mL}$ , 80  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{g/mL}$  de bromuro de etidio en cada tubo, posteriormente los tubos se incubaron por 24 horas, concluido el tiempo de incubación se registró la presencia o ausencia de crecimiento.

Para esta prueba se utilizó como control negativo a *Staphylococcus aureus* ATTC25923 (cepa utilizada en control de calidad).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la resistencia o multirresistencia bacteriana, para lo cual se recolectaron 22 muestras orales de 11 individuos adultos jóvenes asintomáticos, las cuales fueron aisladas y posteriormente sometidas a su caracterización inicial para observar su resistencia a antibióticos; con base a lo anterior se seleccionaron 14 muestras.

Con respecto a las 8 muestras restantes, éstas fueron descartadas debido a no presentar crecimiento en presencia de alguno de los antibióticos probados y en consecuencia no ser de utilidad para las pruebas realizadas en este proyecto.

A continuación se muestran los resultados de las muestras iniciales que presentaron resistencia a los primeros antibióticos probados.

**Tabla 2.** Resistencia bacteriana a los primeros antibióticos probados.

MUESTRA (cepa)	AMPICILINA	CEFOTAXIMA
1 (A11)	+	+
2 (A12)	+	+
3 (Ab1)	+	+
4 (Ab2)	+	+
5 (E1)	+	+
6 (E2)	+	+
7 (C1)	+	+
8 (C2)	+	+
9 (M1)	+	+
10 (M2)	+	+
11 (R1)	+	+
12 (R2)	+	+
13 (P1)	+	+
14 (V1)	+	+

**+ Presencia de crecimiento, - Ausencia de crecimiento**

Como se observa en la tabla 2 todas las muestras presentaron resistencia a los dos antibióticos probados ampicilina y cefotaxima. Posteriormente, estas muestras fueron purificadas.



**Figura 16.** Ejemplo de la purificación de una cepa en medio McConkey

Las 14 cepas seleccionadas para este estudio fueron aisladas a partir de dos zonas orales de individuos asintomáticos, específicamente dientes y encías, como se observa en la figura 17. De los muestreos realizados en dientes se obtuvieron un mayor número de cepas aisladas (57%) mientras que de encías se obtuvo un (43%).



**Figura 17.** Distribución de las bacterias aisladas de las zonas (dientes y encías) orales de individuos asintomáticos.



De las 14 cepas que se utilizaron en este estudio, 4 cepas fueron de bacilos Gram negativos correspondiente a un 29% de las cepas totales y 10 fueron de cocos Gram positivos, lo cual corresponde a un 71% de las cepas totales (Tabla 3).

**Tabla 3.** Número y porcentaje de cepas Gram negativas y Gram positivas totales.

Tipo de cepa	Número de cepas aisladas	Porcentaje (%)
Bacilos Gram negativos	4	29
Cocos Gram positivos	10	71
Total	14	100

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS

### Gram positivos

Con respecto a los cocos Gram positivos, para poder diferenciar a los dos géneros de *Streptococcus* y *Staphylococcus* se llevó a cabo lo siguiente.

Las pruebas efectuadas fueron: catalasa y coagulasa. La prueba de catalasa se utiliza generalmente para diferenciar al género *Staphylococcus* (+) del género *Streptococcus* (-). El microorganismo *Staphylococcus aureus* cuenta con la enzima de la coagulasa, la que le confiere a este microorganismo la capacidad de coagular el plasma sanguíneo; se realizó esta prueba para diferenciar a este microorganismo de las demás especies de *Staphylococcus*.

Se obtuvo que nueve de las diez cepas correspondieron al género *Streptococcus* sp. y una cepa fue perteneciente a la especie *Staphylococcus coagulasa negativo*.

### Gram negativos

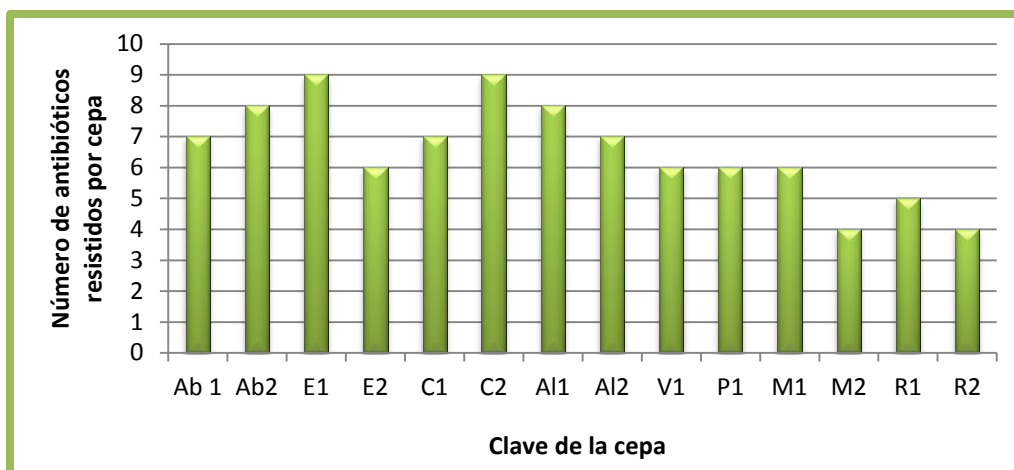
Se obtuvo una cepa perteneciente a la especie *Klebsiella oxytoca*, dos cepas correspondientes a la especie *Enterobacter cloacae*, y una cepa perteneciente a la especie *Escherichia coli*.

## ANTIBIOGRAMA (MÉTODO DE KIRBY-BAUER)

Posteriormente, a las cepas se les realizó un perfil de multirresistencia, lo cual consistió en realizar el antibiograma por el método de Kirby-Bauer, el cual es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. En este método el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio.

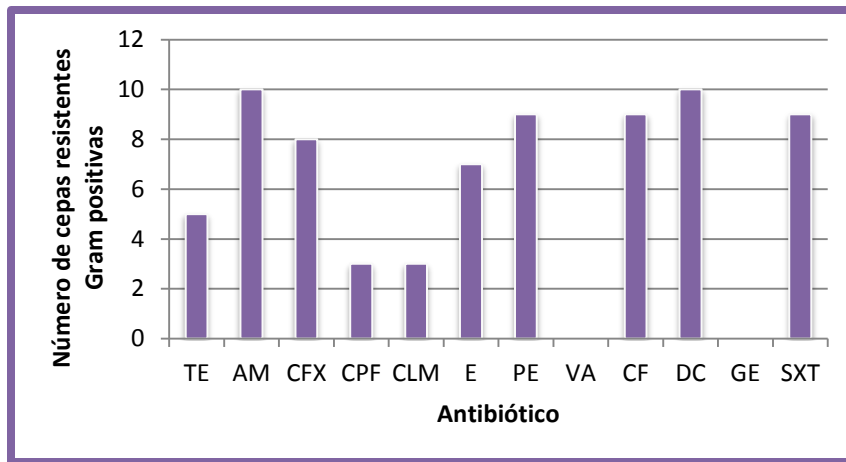
Tomando en cuenta lo anterior, estas pruebas de susceptibilidad se realizaron con la finalidad de fijar un límite entre las bacterias sensibles y resistentes, que permitió establecer un criterio para identificar a las bacterias multirresistentes (con resistencia a dos o más antibióticos).

Los resultados obtenidos con respecto al número de antibióticos resistidos indicaron que todas las cepas presentaban multirresistencia a los antibióticos, como se puede observar en la figura 18, debido a que presentaron resistencia a un mínimo de 4 antibióticos y a un máximo de 9 antibióticos distintos, esto puede deberse a que la bacteria sufre mutaciones y/o que se están llevando a cabo uno o más mecanismos de resistencia. El promedio de resistencia de las cepas estudiadas fue de siete antibióticos.



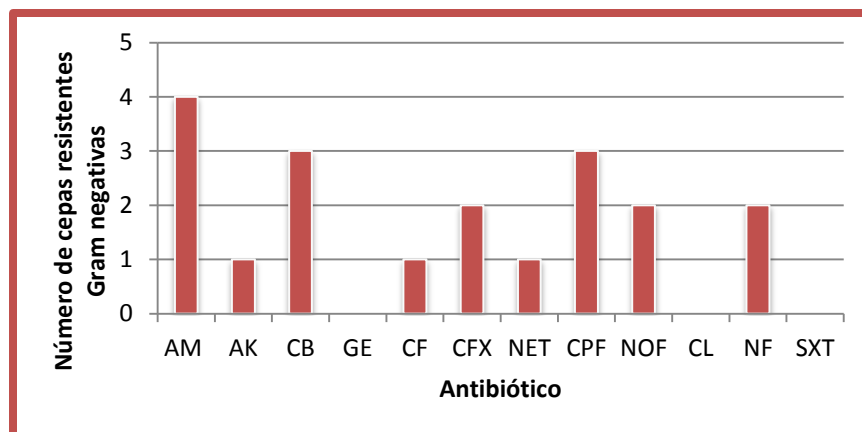
**Figura 18.** Representación gráfica del número de antibióticos resistidos por cepa.

A continuación, en la figura 19 se muestran a las diez cepas Gram positivas y se puede observar que el total de estas cepas fueron resistentes a AM (Ampicilina) y DC (Dicloxacilina), seguido por nueve cepas resistentes a PE (Penicilina), CF (Cefalotina) y SXT (Sulfametoxazol/Trimetoprim), en el caso contrario se puede observar que ninguna de las cepas fue resistente a VA (Vancomicina) ni a GE (Gentamicina).



**Figura 19.** Número de cepas resistentes Gram positivas por cada antibiótico utilizado para la prueba.

De las cuatro cepas Gram negativas estudiadas, se observó que este total fue resistente a la AM (Ampicilina), seguido por tres cepas resistentes a CB (Carbenicilina) y CPF (Ciprofloxacina); en el caso contrario se puede observar que ninguna cepa fue resistente a GE (Gentamicina), CL (Cloranfenicol) y SXT (Sulfametoxazol/Trimetoprim).



**Figura 20.** Número de cepas resistentes Gram negativas por cada antibiótico utilizado para la prueba.

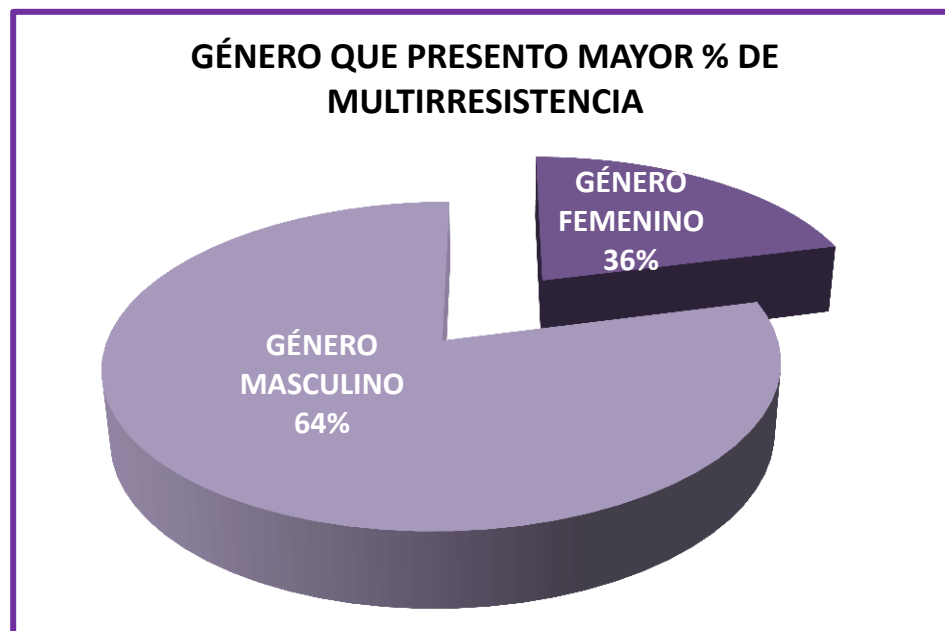


**Figura 21.** Ejemplos de resistencia bacteriana a diferentes antibióticos.

### DISTRIBUCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS CON RESPECTO AL GÉNERO

**Tabla 4.** Número de cepas que presentaron multirresistencia con respecto al género.

	Género Femenino	Género Masculino
Número de cepas que presentaron multirresistencia a antibióticos	5	9



Como se observa en la gráfica, se observó que el género que presentó mayor porcentaje de multirresistencia bacteriana fue el género masculino con un 64%.

## REPLICA PLATING

Posteriormente, con la finalidad de conocer la frecuencia relativa de bacterias resistentes a antibióticos en la población total de bacterias cultivables presentes en el microbioma oral de voluntarios asintomáticos, se llevó a cabo la replicación de la población de bacterias multirresistentes frente a dos antibióticos (ampicilina y cefotaxima). De acuerdo a la tabla 5, en todas las cepas se observó un determinado porcentaje de resistencia.

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de Replica Plating de Lederberg.

MUESTRA (Cepa)	Número de colonias sin antibiótico	Número de colonias con Ampicilina	% Resistencia	Número de colonias con Cefotaxima	% Resistencia
1 (AI1)	480	276	57.50%	79	16.50%
2 (AI2)	768	346	45.10%	165	21.50%
3 (Ab1)	1560	523	33.50%	244	15.60%
4 (Ab2)	1664	898	54.00%	297	17.80%
5 (E1)	984	624	63.40%	322	32.70%
6 (E2)	536	376	70.10%	221	41.20%
7 (C1)	456	267	58.60%	86	18.90%
8 (C2)	1584	1024	64.60%	326	20.60%
9 (M1)	992	736	74.20%	151	15.20%
10 (M2)	1272	498	39.20%	293	23.00%
11 (R1)	544	256	47.00%	102	18.70%
12 (R2)	2032	1376	67.70%	432	21.30%
13 (P1)	1522	543	35.70%	297	19.50%
14 (V1)	1464	454	31.00%	185	12.60%

Estos resultados son de gran interés ya que como se observa en la tabla anterior, con respecto al antibiótico ampicilina son resistentes más del 30% de las bacterias cultivables presentes en la cavidad oral de individuos asintomáticos.

Con respecto a la cefotaxima aunque para todas las muestras totales los porcentajes de colonias resistentes fueron menores a los obtenidos con la ampicilina, cabe mencionar que no las inhibió en su totalidad, lo cual nos indica que en todas las muestras estudiadas existen bacterias resistentes a ambos antibióticos utilizados, obteniéndose que más del 12% de éstas bacterias son resistentes a ambos antibióticos.

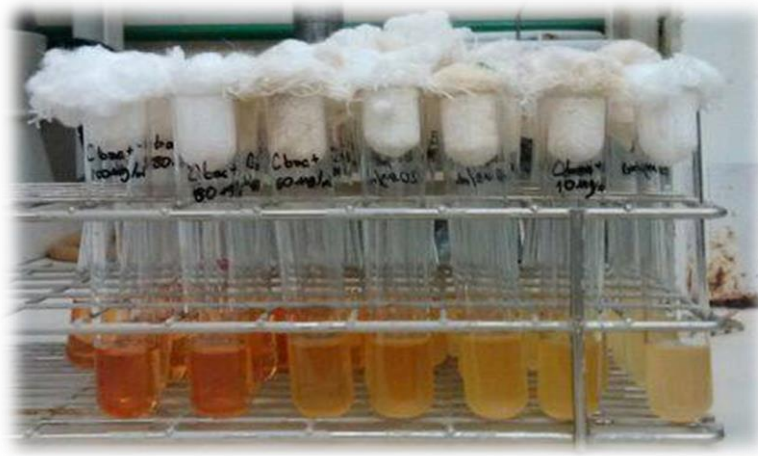
**Tabla 6.** Porcentaje promedio de resistencia observada en las muestras utilizadas.

	Ampicilina	Cefotaxima
% (Promedio) de colonias resistentes a los antibióticos utilizados.	<b>53.0 %</b>	<b>23.2%</b>

De acuerdo a la tabla 6, se registró un mayor porcentaje promedio de resistencia bacteriana a la ampicilina y un menor porcentaje de resistencia bacteriana a la cefotaxima.

Esta prueba permitió determinar si el fenotipo de multiresistencia era ocasionado por unas pocas colonias o por una fracción amplia de la población general de las bacterias.

## PRUEBA DE BROMURO DE ETIDIO



**Figura 22.** Ejemplos de algunos resultados obtenidos en la prueba de bromuro de etidio.

Se ha explicado que la resistencia a antibióticos y a otros agentes citotóxicos puede ser de tipo intrínseca o adquirida. Dentro de los factores involucrados en la resistencia de tipo intrínseca se encuentran: la ausencia del blanco o la presencia de blancos con baja afinidad, baja permeabilidad al compuesto tóxico, inactivación del compuesto y la presencia de mecanismos de eflujo (expulsión). La actividad de estos mecanismos puede conducir a la aparición de perfiles de resistencia más amplios en donde se involucra a una gran variedad de compuestos tóxicos no relacionados (por transportadores de multirresistencia MDR). Se ha sugerido que la sobre-expresión de estos mecanismos lleva al desarrollo de altos niveles de resistencia, dando como resultado un fenotipo de multirresistencia (*Ammor et al., 2008*).

Una vez identificadas las cepas como multirresistentes a antibióticos se quiso conocer el fenotipo de la sobreexpresión de las bombas de expulsión con el bromuro de etidio, como se mencionó anteriormente, un sustrato conocido para la mayoría de las bombas de eflujo de MDR. La presencia de los mismos en combinación con otros mecanismos genera altos niveles de resistencia entre patógenos y comensales originando un consecuente fracaso terapéutico.

El bromuro de etidio es un sustrato conocido para muchas de las bombas de eflujo, por lo tanto, un microorganismo que presente un fenotipo de eflujo requerirá de concentraciones más altas del compuesto para sufrir daño. En esta prueba se evaluó la capacidad de las cepas de desarrollarse y sobrevivir a diferentes concentraciones del sustrato anteriormente mencionado.

En la tabla 7 se presentan los resultados de la concentración máxima a la cual se observó turbidez en los tubos con medio de cultivo y bromuro de etidio.

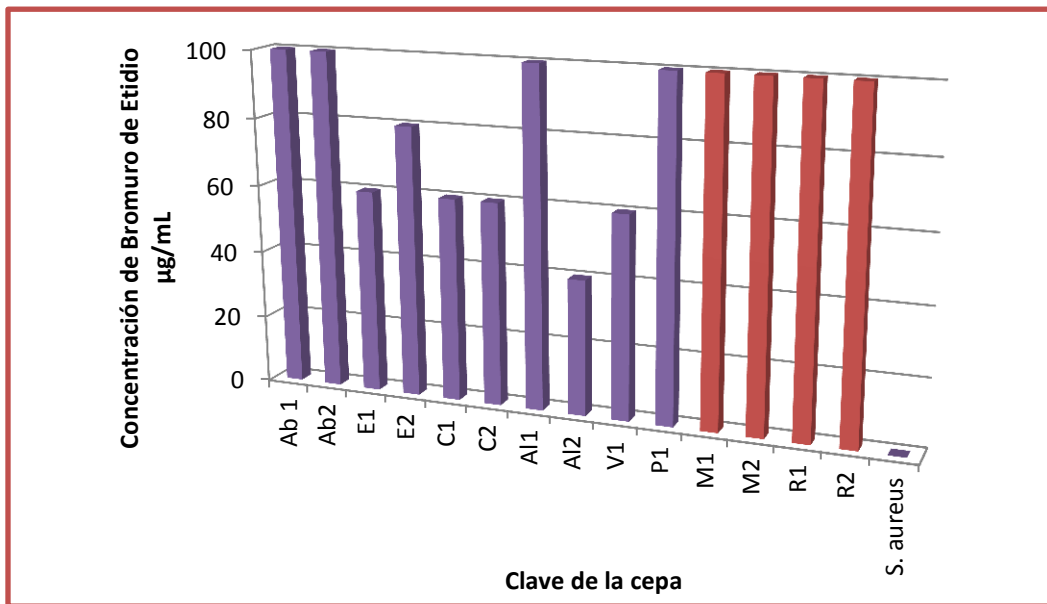
**Tabla 7.** Concentración máxima de bromuro de etidio a la cual las bacterias aún crecían.

Cepa	Concentración de Bromuro de Etidio (µg/mL)	Cepa	Concentración de Bromuro de Etidio (µg/mL)
Al1	100	C2	60
Al2	40	M1	100
Ab1	100	M2	100
Ab2	100	R1	100
E1	60	R2	100
E2	80	V1	60
C1	60	P1	100

Como se mencionó anteriormente, las cepas se expusieron a diferentes concentraciones de bromuro de etidio. En la figura 23 se puede apreciar que las barras de color morado representan las 10 cepas Gram positivas y las barras rojas corresponden a las 4 cepas Gram negativas, la última barra corresponde a la cepa control utilizada *Staphylococcus aureus* (sensible a todos los antibióticos). Todas las cepas Gram negativas que se analizaron presentaron crecimiento a la concentración más alta (100µg/mL) de bromuro de etidio que se utilizó en la prueba; con respecto a las cepas Gram positivas solo 4 presentaron crecimiento a la concentración más alta a la que fueron expuestas, esto nos sugiere que está ocurriendo una expresión aumentada de estas bombas de expulsión, ya que por lo general las bacterias no sobreviven a concentraciones altas de este compuesto. Con respecto a las demás cepas, éstas fueron capaces de continuar su desarrollo



a una concentración mayor de 20 µg/mL. Como era de esperarse, *S. aureus* no registró crecimiento al exponerlo a la menor concentración utilizada de 5µg/mL.



**Figura 23.** Representación gráfica de la concentración máxima de Bromuro de etidio a la cual las cepas aún crecían.

## 7. CONCLUSIONES

- Mediante un método no invasivo se aislaron bacterias provenientes de dientes y encías de individuos adultos jóvenes asintomáticos.
- Se determinó la existencia de bacterias resistentes a más de cuatro antibióticos en muestras orales de voluntarios jóvenes asintomáticos.
- Más del 30% de las bacterias presentes en la cavidad oral de individuos asintomáticos son resistentes a por lo menos un antibiótico.
- A través de un estudio cualitativo con bromuro de etidio se demostró la sobreexpresión de las bombas de expulsión en las bacterias estudiadas, las cuáles también podrían jugar un papel determinante en la multirresistencia presentada.

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no solo pueden anular la acción curativa en el curso del tratamiento, sino que tiene consecuencias todavía más graves para la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de cepas resistentes. El incremento en la prevalencia de la resistencia a antibióticos en bacterias patógenas es el resultado de la evolución y la presión selectiva debida al amplio uso de antibióticos en medicina, veterinaria, agricultura y nutrición de animales.

Tratándose de un problema de salud pública mundial, es inminente que se establezcan en todos los países medidas que permitan disminuir la incidencia de resistencia a antibióticos y especialmente en enfermedades prevalentes.

Para este fin, los profesionales de la salud deben conocer muy bien la estadística de la resistencia, el manejo de patologías infecciosas que no requieren antibióticos, los protocolos de manejo de antibióticos que se establecen para

disminuir la resistencia ya reportada y el manejo de procedimientos de higiene en centros de salud, que son difíciles de establecer.

En la agricultura y cría de animales se hace indispensable que la población tome conciencia de las consecuencias en el manejo de antibióticos como estrategia para disminuir la muerte por infecciones de estos animales y sin discriminación sean aplicados en forma profiláctica.

El conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia es útil para desarrollar nuevos fármacos que evadan los mecanismos de resistencia presentes y para poder elegir nuevas combinaciones antibióticas, más eficaces para el tratamiento de las infecciones producidas por las bacterias.

El esclarecimiento de los mecanismos de multirresistencia, el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y la implementación de alternativas terapéuticas sin el manejo prudente de los antibióticos, solo ayudará a generar conocimiento pero no a controlar y minimizar la emergencia y diseminación de resistencia. Es de importancia fundamental no perder de vista la estrategia más eficaz contra la resistencia a los antimicrobianos: el uso racional. El uso racional de los antimicrobianos tiene como objetivo fundamentalmente limitar el desarrollo de microorganismos resistentes para obtener el mayor beneficio para el enfermo.

En el futuro, se seguirán desarrollando nuevas moléculas antibióticas que posiblemente tengan un mejor efecto que los antibióticos actuales o mejorando un grupo de ellos produciendo antibióticos de nueva generación. Sin embargo, debemos controlar una serie de factores que facilitarán el incremento y aceleración de la aparición de cepas resistentes. Para ello es necesario vigilar permanentemente los niveles de resistencia de cada especie bacteriana y de esta forma poder realizar una selección antibiótica racional que beneficie a los pacientes y, de esta forma, tratar de disminuir el riesgo de aparición de cepas bacterianas resistentes (Paredes, 2004).

Con todo lo anterior es posible concluir que las bacterias poseen una gran capacidad de adaptación y de supervivencia frente a los agentes antimicrobianos, los cuales, a pesar de ser productos derivados del interés de la industria farmacéutica por contrarrestar efectivamente las enfermedades que se presentan tanto en animales como en humanos, y que son originadas por estas células procariotas, han sido superados tanto por los mecanismos de resistencia, como por la capacidad de transmisión de dicha resistencia entre especies iguales y diferentes, lo que es posible gracias a la recombinación genética bacteriana.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aires, J.R., Kohler, T., Nikaido, H. **Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides.** Antimicrob Agents Chemother. 43 (11): 2624 – 2628, 1999.
2. Ammor, M.S. et al. **Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria.** Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 14: 6 – 15, 2008.
3. Ausina – Ruíz, Moreno – Guillén S. **Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.** Madrid: Médica Panamericana, 2005.
4. Baquero, F. **The microbiome as a human organ.** Clin Microbiol Infect. 18: 2 – 4, 2012.
5. Basualdo J., Torres R., **Microbiología Biomédica,** 1996.
6. Borges-Walmsley, M. **Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs.** Biochemical Journal. 376:313-338, 2003.
7. Brock. **Biología de los microorganismos.** 12 ED. pp 396 – 402, 2009.
8. Cabrera, C., Mejía C. **Los mecanismos de Resistencia a antibióticos: ¿Podremos lograr un equilibrio entre el uso – abuso de los antibióticos y así lograr la disminución bacteriana a estos medicamentos.** Salud libre. 3 (1): 83 – 104, 2008.
9. Calvo, J. **Mecanismos de acción de los antimicrobianos.** Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 27:44 – 52, 2009.
10. Cancho – Grande, B. **El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual.** Cienc Tecnol Aliment. 3: 39 – 47, 2000.
11. Carattoli, A. **Importance of integrons in the diffusion of resistance.** Veterinary Research. 32: 243 – 259, 2009.
12. Cordiés, L., et al. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.** Acta médica. 8 (1): 13 – 27, 1998.
13. Curtis, H., Schneek, A., Flores, G. **Invitación a la biología:** Editorial Medica Panamericana, 2006.

14. Daza, P. **Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria.** Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 22: 57 – 67, 1998.
15. Dewhirst, F. **The human oral microbiome.** Journal of Bacteriology. 192(19):5002-5017, 2010.
16. **Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM), 2005.**
17. Donlan, Costerton JW. **Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms.** Clinical Microbiology Reviews. 167-93, 2002.
18. Dubnau, D. **Genetic competence in Bacillus subtilis.** Microbial Mol Biol Rev. 55: 395 – 424, 1991.
19. Errecalde, D.J. **Uso de antimicrobianos en animales de consumo.** Incidencia del Desarrollo de Resistencias a la Salud Pública, 2004.
20. Fernández – Riverón. **Resistencia bacteriana.** Enf Inf Mocrbiol. 32 (1): 44 – 48, 2003.
21. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2011.**
22. Ferraro, M.J. 2000. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** National Committee for Clinical Laboratory Standards. 20 (2): 5- 7, 2000.
23. Fine DH. **Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry.** Am J Dent. 1:259-63, 1998.
24. Furuya, E.Y., Lowy, F.D. **Antimicrobial-resistant bacteria in the community settin .**Nat. Rev. Microbiol. 4:36,2006.
25. Galun, E. **Bacterial insertion secuencias. In: Transposable elements.** Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Ntherlands, 2003.
26. García R., García S.E. **Resistencias bacterianas y antibioterapia: Eficacia in vivo. Eficacia in vitro.** Madrid-Barcelona: ed Doyma, S.A. 30 – 50,1997.
27. García, J. M. **Estructura, funcionamiento y significado de los integrones bacterianos.** Actualidad, Sociedad Española de Microbiología. 28: 18-22, 1999.

28. Garza, R., Silva, S., J., Martínez, R., E. **Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana.** *Salud pública de México.* 51: 439 – 446, 2008.
29. Gerard, D. **Evaluation of antibiotic usage: A comprehensive look at alternative approaches.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 2927 – 2932, 2007.
30. Gold, S.H. Moellering, R.C. **Antimicrobial – Drug resistance.** *N Eng J Med.* 335 (19): 1445 – 1453, 1996.
31. Gómez, L. **Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades.** *International Microbiology.* 1:279-284, 1998.
32. Gottesman, M.M. **Biochemistry of multidrug resistance by the multidrug transporter.** *Annu Rev Biochem,* 62:385-427, 1993.
33. Grkovic, S. **Regulation of bacterial drug export systems.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 66 (4):671-701, 2002.
34. Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA. **Health and economic impacts of antimicrobial resistance.** *Rev Infect Dis.* 9: 1065-1078, 1987.
35. Huggins, C. **Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters.** *Nature.* 446:749-757, 2007.
36. Jack, D., Yang, N., and Saier, M. **The drug/metabolite transporter superfamily.** *Eur J. Biochem.* 68:3620 – 3639, 2001.
37. Kummerer, J.L. **Resistance in the environment,** *J Antimicrob Chemother.* 54: 311 – 320, 2004.
38. Levy, SB. **the challenge of antibiotic resistance.** *Scientific American.* 14:46-53, 1998.
39. Levy S.B. **Antibiotic resistance: consequences of inaction.** *Clin Infect Dis.* 33 (3): S124 – S129, 2001.
40. Li, Xian – Zhi., Nikaido, H. **Efflux – mediated drug resistance in bacteria: an update.** *Drugs.* 69 (12): 1555 – 1623, 2009.
41. Liébana, J., Castillo, A.M. **Ecología oral. Tratado de Odontología.** Madrid:Trigo, pp. 665 – 669, 1998.
42. Lynch, A. **Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention.** *Biochem Pharmacol.* 71: 949 – 956, 2006.

43. Maestre, J.R. **Infecciones bacterianas mixtas de la cavidad oral.** *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 20 (2): 98 – 101, 2002.
44. Marchetti, M. L. **Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionados por bombas de eflujo. Impacto en la multiresistencia.** 31 (2): 40 – 53, 2011.
45. Martínez, J.L. **The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria.** *Proc R Soc B.* 276: 2521 – 2530.
46. Molina López, **Terapeutica, Drogas antibacterianas,** Facultad de Medicina, UNAM, 2014. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologiatrapeutica.html>
47. Nikaido, H. **Efflux – mediated drug resistance in bacteria.** *Drugs.* 62 (2): 159 – 204, 2004.
48. Nikaido, H. **Multidrug resistance in bacteria.** *Annu Rev. Biochem.* 78:119-146, 2009.
49. Normark, B.H. **Evolution and spread of antibiotic resistance.** *Journal of Internal Medicine.* 253: 91 – 106, 2002.
50. Organización Mundial de la Salud. **The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals.** Reporte de la OMS, Berlín, Alemania, 1997.
51. Orman, B. **La Resistencia bacteriana y sus mecanismos de dispersión.** *Revista de la Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.* 21(50/51): 13 – 19, 2006.
52. Pérez – Cano. **Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana.** *Revista médica.* 4 (3): 186 – 191, 2013.
53. Paredes, F., Roca J. **Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana.** *OFFARM.* 23 (39): 116 – 124, 2004.
54. Paulsen, I., Brown, M., Skurray, R. **Proton – dependent multidrug efflux systems.** *Microbiol Rev.* 60 (4): 575 – 608, 1996.
55. Peleg, A. **Hospital – acquired infections due to Gram – negative bacteria.** *The New England Journal of Medicine.* 362: 1804 – 1813, 2010.



56. Piddock, L. **Efflux – mediated multiresistance in Gram – negative bacteria.** Clin Microbiol Infect. 10: 12 – 26, 2004.
57. Piddock, L. **Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria.** Clinical microbiology reviews. 19 (2): 382 – 402, 2006.
58. Prieto – Prieto, J., Calvo, A. **Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos.** Med Oral Patol Oral Bucal. 9: S11 – S8, 2004.
59. Rodríguez – Alonso E., Rodríguez – Monje M.T. **Tratamiento antibiótico de la infección odontogénica.** Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 33(3): 67 – 79, 2009.
60. Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. **Resistance gene capture.** Current Opinion in Microbiology. 2: 483-488, 1999.
61. Sánchez, P. **Sistema MDR y Resistencia a los antimicrobianos.** Rev Esp Quimioterap. 16 (2): 172 – 187, 2003.
62. Sánchez, R. **¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana?** Química Viva, 2006.
63. Sánchez, P., Muñoz R., Gutiérrez, N. **Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia.** 8 (17): 31 – 37, 2012.
64. Serrano-Granger J, Herrera D. **La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla?** RCOE. 10(4):431-439, 2005.
65. Shaw, K.J., Rather, P.N. **Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.** Microbiol. Rev., 57: 138-163, 1993.
66. Shuldiner, S., Lebediker, M. **EmrE, the smallest ion – coupled transporter, provides a unique paradigm for structure – function studies.** J Exp Biol. 200: 335 – 341, 1997.
67. Socransky SS, Haffajee AD. **Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles.** Periodontol.3:12-55, 2003.
68. Sussmann OA, Mattos L, Restrepo A. **Apuntes de resistencia bacteriana,** 2001. URL disponible en:

<http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>.

69. Taroco R, Seija V. et cols. **Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas Bacteriología y Virología.** Instituto de Higiene, Montevideo. 36: pp. 663-671, 2006.
70. Tenover F.C. **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.** The American journal of medicine. 119 (64): S3 – S10, 2006.
71. Thomson KS, Smith ME. **The New  $\beta$ -lactamasas on gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium.** Microbes and Infection. 2: 1225-1235, 2000.
72. Torres, C. **La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming.** Academia de farmacia, 2012.
73. Universidad Politécnica de Valencia. **Procedimiento Estándar para trabajo con Bromuro de Etidio, 2010.** <http://www.sprl.upv.es/D7211b.htm>.
74. Van Bambeke, F., Balzi, E. **Antibiotic efflux pumps.** Biochem Pharmacol. 60(4): 457 – 470, 2000.
75. Walsh, C. **Molecular mechanisms that confer antibacterial drugs resistance.** Nature. 46: 775 – 781, 2000.
76. Webber, M. **Measuring the activity of active efflux in Gram negative bacteria,** pp 232 – 241. 2 ED, 2010.
77. Wrigth, G.D. **Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification.** Advanced Drug Delivery Reviews. 57: 1451 – 1470, 2005.
78. Yerushalmi, H., Lebediker, M., **EmrE, an Escherichia coli 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H<sup>+</sup> and is soluble in organic solvents.** J. Biol. Chem., 271:31044 – 31048, 1995.
79. Yin, J. Chang, G. **Structure of the multidrug transporter EmrD from Escherichia coli.** Science. 5 (312): 741 – 744, 2006.
80. Zechini, B. **Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria.** Recent patents on anti-infective drug discovery. 4: 37-50, 2009.