



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III

Caracterización y distribución de serotipos
de la bacteria *Aggregatibacter*
actinomycetemcomitans en pacientes
marroquíes diagnosticados de periodontitis
y de origen y residencia en Marruecos.

María Mínguez Arnau

Tutor: Prof. Dr. Mariano Sanz Alonso



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
III. MATERIAL Y MÉTODOS	9
IV. RESULTADOS	16
V. DISCUSIÓN	20
VI. CONCLUSIONES	23
VII. BIBLIOGRAFÍA	24
TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS	29



I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales están causadas por microorganismos que se organizan formando un biofilm adherido a la superficie dental y por debajo del margen gingival (Mombelli y cols. 1999).

Dentro de este grupo de enfermedades, existe una clara diferenciación entre periodontitis crónica y agresiva (Armitage y cols. 1999). La primera es una forma de periodontitis lentamente progresiva que, en cualquier momento, puede sufrir una exacerbación aguda, que cursa con una pérdida de inserción adicional; es la entidad más común, con una prevalencia de entre 13% y 57% a nivel mundial, sin diferencias significativas entre distintos grupos étnicos (Van der Velden y cols. 2006).

La periodontitis agresiva, sin embargo, es una forma de enfermedad periodontal rápidamente progresiva, caracterizada por una destrucción significativa de la inserción periodontal a una edad temprana y con una clara tendencia a la agregación familiar de casos. (Tonetti y Mombelli 1999). A diferencia de la periodontitis crónica, la prevalencia de la periodontitis agresiva varía entre distintos grupos étnicos, con un valor de menos del 1% en los caucásicos y más del doble, 2.6% en algunos grupos de poblaciones africanas (Brown y cols. 1996).

La prevalencia de la periodontitis agresiva es especialmente alta en adolescentes de origen marroquí, con un porcentaje de 7.6 (Haubek y cols. 2001) y en una población israelí de origen norte-africano, con una prevalencia de 5.9-38 % (Levin y cols. 2006), así como en una población indonesia (Timmerman y cols. 1998). Una posible explicación de esta alta prevalencia podría ser la colonización en estas poblaciones por cepas altamente patógenas de las bacterias asociadas a la etiología de la periodontitis (periodonto-patógenos).

Entre los periodonto-patógenos, existen tres especies bacterianas con una evidencia fuerte de asociación con las periodontitis, que son *Aggregatibacter*



actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (Haffajee y Socransky 1994)

A. actinomycetemcomitans ha sido descrito como uno de los factores principales en la etiología de las periodontitis refractarias y de comienzo temprano (Haffajee y cols. 1988, Slots y cols. 1999).

Dicha bacteria es un coco- bacilo, con bordes redondeados, pequeño, no mótil, gram – y no esporulado. Como características bioquímicas cabe resaltar que es sacarolítico, catalasa positivo, capnofílico y anaerobio facultativo. Forman pequeñas colonias (de aproximadamente 1 mm de diámetro tras 2-3 días de incubación) y son convexas, circulares, translúcidas y con contornos irregulares y una configuración interna descrita como “estrellada”.

A.actinomycetemcomitans produce distintos factores de virulencia para evadir los mecanismos de defensa del huésped. La leucotoxina es el más extensamente estudiado.

La leucotoxina es un producto de una proteasa, termolábil, perteneciente a la familia de las toxinas *repeats in toxin*, que tiene la capacidad de producir la lisis de los leucocitos polimorfonucleares (Baehni y cols. 1979), de los monocitos humanos (Taichman y cols. 1980) y de la línea celular de los neutrófilos (Zambon y cols. 1983) produciendo perturbaciones en la membrana de las células y evadiendo una parte importante de sistema inmune innato del hospedador. Dicha leucotoxina está codificada por un operón de un gen, que consiste en cuatro genes, *ltx C*, *ltxA*, *ltxB* y *ltx D*, de los cuales, *ltxA* es el estructural (Lally y cols. 1989).

Respecto a la leucotoxina, existe una delección de 530 pares de bases en la región promotora del gen operón de la leucotoxina de cepas que muestran niveles de actividad de la leucotoxina incrementada de diez a veinte veces (Brogan y cols.1994), estas cepas altamente virulentas reciben el nombre de clon JP2 de



A.actinomycetemcomitans y tiene características similares a las propias de un patógeno exógeno (Haubek y cols. 2010).

Dicha delección sirve como un marcador del clon JP2, pero su papel exacto en la patogénesis de la enfermedad periodontal es todavía desconocido (Kilian y cols. 2006).

Los aislados caracterizados con la cepa altamente leucotóxica de *A.actinomycetemcomitans* pertenecen exclusivamente a sujetos o familias con historia de periodontitis agresiva (Haubek y cols. 1996, 1997, Bueno y cols. 1998, Macheleicht y cols. 1999, Mombelli y cols. 1999, Harazthy y cols. 2000).

Además, se ha demostrado, con un diseño longitudinal, y en un grupo de 700 adolescentes marroquíes, que la cepa JP2 puede considerarse un agente etiológico de la periodontitis agresiva en pacientes con residencia o que provienen del norte-oeste de África (Haubek y cols.2008). Este clon, a pesar de ser endémico en el norte de África, ha sido aislado en inmigrantes africanos en países europeos (Haubek y cols. 1997).

La infección con el clon JP2 no es solamente un factor de riesgo de periodontitis de comienzo temprano, sino que los pacientes infectados con dicho clon presentan estadios más avanzados de enfermedad que los pacientes libres de este clon (Haubek y cols. 2001).

Por otra parte, la expresión de la leucotoxina en las cepas mínimamente leucotóxicas, denominadas cepas 652 de *A.actinomycetemcomitans*, está dirigida por un solo promotor que no se corresponde con ninguno de los dos promotores que actúan en la expresión de la leucotoxina en las cepas JP2 y carece de la delección de 530 pares de bases, lo cual resulta en una asociación con una severidad menor de la enfermedad periodontal.

Actualmente se distinguen 6 serotipos de *A.actinomycetemcomitans* (a-f) en función del tipo de polisacárido que conforma el antígeno inmunodominante de la membrana, el lipolisacárido (LPS) (Kaplan y cols. 2001).



Un único serotipo tiende a colonizar un individuo, aunque no es raro encontrar niveles elevados de respuesta de anticuerpos en suero a distintos serotipos en una misma muestra. Esto se hace especialmente evidente en una población japonesa, en la que un 33% de localizaciones en las que la bacteria estaba presente mostraban la colonización por dos o tres serotipos distintos (Yoshida y cols. 2003). El mismo grupo de Japón encontró una asociación entre determinados serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y la presencia de otros miembros de la microbiota. La frecuencia del serotipo c era mayor en localizaciones con presencia de *P. gingivalis* que en casos de ausencia de dicha bacteria.

Se ha observado que los serotipos a y b se encuentran más asociados a pacientes con periodontitis (como el clon JP2) y con infecciones no-orales asociadas a *A. actinomycetemcomitans*, y que el serotipo c, por el contrario, suele aislarse en sujetos sanos. Los serotipos d y e se encuentran raramente en todas las poblaciones (Henderson y cols. 2003).

Aunque existe una asociación clara entre la distribución de los serotipos de *A. actinomycetemcomitans* y la condición periodontal, no hay evidencia de que el antígeno del serotipo *per se* sea un determinante claro de virulencia de la bacteria (Rylev y cols. 2008).

A. actinomycetemcomitans produce otro factor de virulencia, conocido como el operón *cytolethal distending toxin* (CDT) que codifica una toxina que suprime el ciclo celular en la fase G2, por lo que se inhibe la proliferación y se induce la muerte celular (Lara-Tejero y Galán 2000).

Los genes del CDT, *a*, *b* y *c* están presentes en un 80% de las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, aunque la asociación con la enfermedad no ha sido aún determinada (Fine y cols. 2006). Se necesitan más estudios para dilucidar si existen diferencias entre cepas que colonizan distintas poblaciones étnicas.



II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

En Marruecos no se han realizado estudios orientados a la caracterización, en cuanto a los serotipos, de cepas de *A. actinomycetemcomitans*, ni se ha determinado la prevalencia de cepas productoras de CDT. Teniendo en cuenta la amplia variabilidad genética que caracteriza a este microorganismo y la alta incidencia de cepas altamente virulentas en regiones del Norte de África, geográficamente cercanas a España, se hace relevante analizar estas cepas.

HIPÓTESIS

En Marruecos, existe una alta prevalencia de pacientes afectados de formas agresivas y severas de periodontitis relacionadas con infección por cepas altamente virulentas de *A.actinomycetemcomitans*.

La hipótesis de este estudio observacional es que los *A.actinomycetemcomitans* aislados de pacientes marroquíes afectados de periodontitis presentan un patrón de virulencia (proporción del clon JP2, serotipo b) diferente a lo publicado en otros estudios sobre la misma bacteria en poblaciones diferentes igualmente afectas de periodontitis.



OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterización y estudio de la distribución de serotipos de la bacteria *A. actinomycetemcomitans* en pacientes marroquíes diagnosticados de periodontitis y de origen y residencia en Marruecos.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Determinar la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* en una población marroquí diagnosticada de periodontitis.
- Caracterizar las cepas aisladas, determinando la distribución de serotipos presentes e investigar la prevalencia de cepas JP2 o altamente virulentas, así como el polimorfismo de los genes que codifican para la toxina CDT en cepas de *A. actinomycetemcomitans* en pacientes periodontales de origen marroquí.



III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. MATERIAL

SELECCIÓN DE PACIENTES

Las muestras microbiológicas fueron recogidas por dos estudiantes del programa de postgrado de Periodoncia de la Universidad Complutense de Madrid.

La muestra de este estudio fueron pacientes marroquíes diagnosticados de periodontitis que iban a recibir tratamiento periodontal en la Facultad de Odontología de la Universidad Mohammed V, Souissi, de Rabat.

En el estudio se incluyeron a los pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*.

Criterios de inclusión:

- Edad comprendida entre 15 y 50 años de edad.
- Diagnóstico de periodontitis crónica o agresiva (Armitage 1999). Además, los pacientes tratados pero con signos de enfermedad o con deficiente respuesta al tratamiento, se clasificaron como una entidad adicional denominada periodontitis refractaria.
- Al menos 4 localizaciones con profundidad de sondaje mayor de 4 mm y al menos 4 localizaciones con pérdida de inserción mayor de 4 mm.

Criterios de exclusión:

- Menos de 16 dientes.
- Enfermedades sistémicas que afectan a la periodontitis.
- Toma de antibióticos en los tres meses previos.
- Tratamiento periodontal en los últimos 6 meses.
- Embarazo o lactancia.



- Patología aguda.

III.2. MÉTODOS

2.1 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

El diagnóstico clínico se llevó a cabo combinando datos clínicos y radiográficos.

Se registraron datos relevantes como la edad, el sexo, la historia de tabaquismo, además de la historia médica y la historia dental, más concretamente, se completó el periodontograma con una sonda manual teniendo en cuenta los siguientes índices:

- Índice de placa dicotómico.
- Índice de sangrado al sondaje dicotómico.
- Índice de supuración dicotómico.

Además, se registraron las siguientes variables:

- Profundidad de sondaje, medida en milímetros desde el margen gingival hasta el nivel alcanzable con la sonda periodontal.
- Recesión, medida en milímetros, desde el margen gingival a la unión amelo-cementaria.
- Pérdida del nivel de inserción clínica, sumando las dos variables anteriores, profundidad de sondaje y recesión.

2.2 RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras microbiológicas fueron recogidas por dos estudiantes del programa de postgrado de Periodoncia de la Universidad Complutense de Madrid.

Las muestras se obtuvieron de la bolsa periodontal más profunda de cada cuadrante, según lo descrito por Mombelli y cols 1991.



En dichas localizaciones, la placa supragingival se eliminó usando una gasa estéril, tras lo que se secó con torundas de algodón y utilizando el chorro de aire.

Se introdujeron dos puntas de papel (Maillefer, Ballaigues, Suiza) en cada localización durante diez segundos.

Las puntas de papel fueron transferidas a los viales que contienen 1.5 ml de Fluído de Transporte Reducido (RTF) (Syed y Loesche 1972), obteniendo un solo vial por paciente agrupando las ocho puntas de los cuatro cuadrantes.

Las muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid para ser procesadas antes de que transcurrieran 24 horas desde que fueron tomadas.

2.3 CULTIVO, AISLAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

Las muestras fueron homogeneizadas utilizando un vórtex y se realizaron diluciones seriadas en solución de tampón sodio-fosfato (PBS).

Se utilizaron alícuotas de 100 µl para sembrar en dos medios distintos:

- Medio agar sangre (No. 2 de Oxoid; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) con 5% de sangre de caballo y hemina (5 mg/l).
- Medio Dentaïd -1 (Alsina y cols. 2001).

Las placas de agar sangre se estudiaron después de 7 y 14 días de incubación anaerobia (80% N₂, 10% H₂; 10% CO₂ a 37°C). Las placas se examinaron para la identificación de *P.gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *T.forsythia*, *Parvimonas micra*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens* y *Fusobacterium* spp, basado en la morfología de las colonias. Las colonias de cada especie bacteriana se determinó como el número total de colonias en una placa representativa, aquella con entre 30 y 300 colonias.



Para el aislamiento y crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* se utilizaron placas de medio Dentaid-1 (Alsina y cols. 2001), que son incubadas durante 3-5 días a 37°C.

Después de este período, las placas fueron examinadas para la identificación de *A. actinomycetemcomitans*, que se basó principalmente en su morfología característica, en la reacción de la catalasa y usando una serie de enzimas específicos (Rapid ID, NH system Romel Inc, EE.UU).

De cada paciente se obtuvieron de dos a tres cepas, las cuales fueron aisladas tras realizar una media de diez pases por cepa y las muestras originales fueron almacenadas a -80° C usando criobolas para asegurar su posterior utilización.

2.4 AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO

Las células cultivadas se recogieron y fueron centrifugadas y resuspendidas en 1ml de tris-HCl 10 mM, EDTA 0.8 mM (ph 8.0) y lisozima (concentración final 5.0 mg/ml).

Tras la incubación a 37°C durante 30 minutos, se añadió proteinasa K a una concentración final de 2 mg/μl, 1 mg/μl y 1 %, respectivamente.

La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. El ADN se extrajo utilizando volúmenes iguales de fenol (saturado con 10 mM Tris-HCl, ph 8.0) y alcohol fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Se llevó a cabo la precipitación de los ácidos nucleicos de la solución usando etanol centrifugado (12.000 rpm), el producto precipitado fue resuspendido en 50 μl de agua destilada estéril. El resultado de la extracción de ADN se comprobó mediante electroforesis, utilizando 5 μl de una alícuota del ADN extraído en un gel de 1% de agarosa con un tampón de tris-acetato de EDTA. Se utilizó bromuro de etidio (10 μg/ml) para teñir el gel y se visualizó bajo iluminación UV.

2.5 SEROTIPIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los serotipos “a” - “f” se determinaron usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



Ésta se basa en secuencias específicas de grupos de genes que determinan los distintos serotipos.

Los cebadores que se utilizaron son los descritos por Kaplan y cols. (2002).

La PCR se realizó utilizando un volumen final de 25 μ l, que estaba compuesto por (Invitrogen Corporation, CA, EE.UU) :

- ❖ 2.5 μ l de tampón 10x.
- ❖ 1.0 μ l de 25 mM Mg Cl₂.
- ❖ 0.5 μ l de 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato.
- ❖ 0.5 U de polimerasa ADN Taq.
- ❖ 1.0 μ l de 25 μ M cebadores.
- ❖ 2 μ l de DNA genómico.

Se utilizó una alícuota de 15 μ l obtenida de cada PCR para realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de tampón TAE y los productos de la PCR se visualizaron tras la tinción con bromuro de etidio (10 mg/ml) y utilizando iluminación ultra-violeta.

La PCR se realizó utilizando un termociclador tipo iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc) y se siguieron los siguientes pasos:

- Desnaturalización a 96°C durante 3 minutos.
- La PCR constó de 35 ciclos (cada uno de ellos constó de):
 1. Desnaturalización a 96°C durante 3 minutos.
 2. Emparejamiento a 55°C durante 1 minuto.
 3. Emparejamiento a 72°C durante 2 minutos.
 4. Extensión a 72°C durante 10 minutos.

Se utilizaron controles positivos y negativos, usando como control negativo agua estéril.



2.6 DETECCIÓN DEL PRODUCTO PUTATIVO DE LA LEUCOTOXINA

Se utilizó la técnica de la PCR para determinar la delección de 530 pares de bases de la región promotora del gen operón de la leucotoxina.

Los cebadores y las condiciones que se utilizaron para determinar la presencia de las cepas JP2 fueron los descritos por Haubek y cols. (1997).

La PCR se realizó utilizando un volumen final de 25 μ l, que estaba compuesta por (Invitrogen Corporation, CA, EE.UU):

- ❖ 2.5 μ l de tampón 10x.
- ❖ 1.0 μ l de 25 mM Mg Cl₂.
- ❖ 0.5 μ l de 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato.
- ❖ 0.5 U de polimerasa ADN Taq.
- ❖ 1.0 μ l de 25 μ M cebadores.
- ❖ 2 μ l de DNA genómico.

Los correspondientes cebadores utilizados fueron, en la secuencia 5'-3' río arriba: 5'-CAGATCAAAACCTGATAACAGTATT-3', y el cebador río abajo sigue la siguiente secuencia: 5' TTTCTCCATATTCCTCCTTCTGT-3'.

La PCR se realizó utilizando un termociclador tipo iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc) y se siguieron los siguientes pasos:

- Desnaturalización a 94°C durante 3 minutos.
- PCR consta de 30 ciclos (cada uno de ellos constó de):
 1. Desnaturalización a 94°C durante 3 minutos.
 2. Emparejamiento a 60°C durante 1 minuto
 3. Extensión a 72°C durante 2 minutos.



El producto de la PCR de 504 pares de bases indicaba la delección de 530 pares de bases correspondiente a la cepa JP2, mientras que el producto de PCR de 1034 pares de bases indicaba la ausencia de la delección en el gen operón de la leucotoxina.

2.7 DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO CDT DE *A.actinomycetemcomitans*

La presencia del operón que codifica para la toxina CDT se determinó usando la PCR y siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero utilizando los cebadores que amplifican el operón completo CdtA1 y CdtC2, que siguen la secuencia 5'-3' y que están descritos en la tabla 2.

El peso total molecular del segmento amplificado fue de 2016 pares de bases cuando el operón completo estaba presente.

Los productos de la PCR se visualizaron utilizando un gel de agarosa al 1%.

III.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se realizó estadística descriptiva (media, desviación estándar, máximo y mínimo, y prevalencia) de las variables demográficas, clínicas y microbiológicas utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007®.



IV.RESULTADOS

Las muestras se obtuvieron de 49 pacientes marroquíes que cumplían los criterios de inclusión, de los cuales 21 pacientes eran positivos para *A.actinomycetemcomitans*.

Se eliminaron del estudio las muestras de 5 pacientes, por problemas con el aislamiento de las colonias, por sobrecrecimiento de las mismas, o por contaminación con hongos, por lo que la muestra final consta de 16 pacientes.

Se aislaron entre 1 y 3 cepas por paciente que se mantuvieron a -80 °C, obteniéndose un total de 41 cepas.

En cuanto a las variables demográficas, todos los pacientes pertenecían al sexo femenino y eran pacientes no fumadores.

La media de edad fue de 26.8 años, con un valor mínimo de 13 y máximo de 46 y la desviación estándar fue de 9.19.

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad periodontal (Gráfico 1), de acuerdo a la Academia Americana de Periodoncia (Armitage 1999, 2000) 9 pacientes sufrían periodontitis agresiva (69.23%), 3 pacientes periodontitis crónica (23.08%), y 1 paciente periodontitis refractaria (7.69%). En éste último paciente, las muestras se tomaron tras el raspado y alisado radicular, y en el resto de pacientes el momento de la toma de muestras fue previo al tratamiento con raspado y alisado radicular. No se dispone de los datos clínicos de los 3 pacientes restantes.

En lo que respecta a las variables clínicas, calculadas por paciente, se pueden observar en la Tabla 3. En las localizaciones elegidas con mayor profundidad de sondaje por cuadrante, la media de la profundidad de sondaje fue de 6.25 mm (4-9.75) con una desviación estándar de 1.79 mm.



En cuanto a la recesión, la media fue de 0.98 mm (0-2.75), con una desviación estándar de 0.86.

Respecto al índice de sangrado y placa, la media fue de 0.83 y 0.81, y las desviaciones estándar fueron 0.26 y 0.34 respectivamente. A nivel general, todos los pacientes presentaron altos valores de placa y sangrado.

La media del índice de supuración es de 0.15 con una desviación estándar de 0.17.

En el análisis de las variables microbiológicas (Tabla 4), la media del recuento total de anaerobios fue de 2.0×10^7 , con una desviación estándar de 1.49×10^7 .

En el análisis de las medias del total de UFC/ml de esta población marroquí, se observó que, en el caso de *A.actinomycetemcomitans* fue de 1.64×10^4 , con una desviación estándar de 2.0×10^4 .

La media de los recuentos fue superior en el caso de *P.gingivalis* (4.42×10^6 UFC/ml), *P. intermedia* (6.25×10^6 UFC/ml), también en el caso de *T.forsythia* (4.87×10^5 UFC/ml), *P.micra* (3.06×10^5 UFC/ml) y *Fusobacterium nucleatum* (2.23×10^5 UFC/ml).

La media del recuento de *C.rectus* fue el menor de todos, con un valor de 4.13×10^3 UFC/ml y el de *E.corrodens* es de 1.08×10^4 UFC/ml.

1. ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE *A.actinomycetemcomitans*

La prevalencia de detección de *A.actinomycetemcomitans* en esta población marroquí afecta con periodontitis fue de 42.86%. Haciendo una diferenciación por grupos, en el grupo de periodontitis crónica existe una prevalencia de *A.actinomycetemcomitans* del 25% y en el grupo de periodontitis agresiva de 40.2%.



En el grupo de pacientes positivos para *A.actinomycetemcomitans*, la prevalencia de *F.nucleatum* fue del 100% (Gráfico 2). Menores valores de prevalencia, aunque elevados, se encontraron para *P.gingivalis* (93.8%) y *P.intermedia* (87.5%).

La media del porcentaje de *A.actinomycetemcomitans* frente al total de anaerobios fue de 0.22% (Tabla 5).

La media de los porcentajes de *P.gingivalis* y *P.intermedia* fue de 18.44% y 19.38%, respectivamente.

2. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE SEROTIPOS EN LA MUESTRA (POR PACIENTE Y POR MUESTRA)

El análisis de la distribución de serotipos por paciente y por cepa se observa en los Gráficos 3, 4 y Figura 1, respectivamente.

Dentro de esta población marroquí, se observó una clara tendencia a la mono infección por serotipo b, un 93.75% de la muestra resultó ser positiva para este serotipo.

En un paciente (6.25%) de la muestra, existió coinfección de dos serotipos distintos: b y c.

3. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA DELECCIÓN DE LA LEUCOTOXINA EN LA MUESTRA (POR PACIENTE Y POR MUESTRA):

Sólo dos pacientes (12.5%) se vieron afectados por la delección de 530 pares de bases en la región promotora del gen operón de la leucotoxina. Se obtuvieron tres cepas del primer paciente y dos del segundo, lo cual supone un 12.19% del total, todas ellas demostraron la delección de acuerdo a producto obtenido en la reacción de PCR. Ver Tabla 6, Gráfico 5 y Figura 2.

Estos dos pacientes pertenecían al grupo de diagnóstico periodontal de periodontitis agresiva, y presentaron una profundidad de sondaje media de 8 mm.



4. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL OPERÓN CDT EN LA MUESTRA (POR PACIENTE Y POR MUESTRA):

En cuanto al análisis por cepa, se observó que un 69.28% de las mismas presentaban el operón CDT, 6 de los 16 pacientes presentaban la caracterización CDT positiva común para todas las cepas pertenecientes al mismo paciente. Ver Tablas 7 y 8, y Figura 3.

Dos pacientes presentaron ausencia del gen CDT como rasgo común de todas las cepas (monoinfección), sin embargo, predominó la presencia de coinfección (combinación de cepas CDT + y CDT – en distintas cepas del mismo paciente) en un total de 8 pacientes.



V. DISCUSIÓN

En este estudio realizado sobre una muestra de 49 pacientes marroquíes se encontró que la prevalencia de detección por cultivo de *A.actinomycetemcomitans* fue de 42.86%.

En concreto, en el grupo de paciente diagnosticados de periodontitis agresiva, la prevalencia de *A.actinomycetemcomitans* fue 40.6%.

Otros estudios que han utilizado la misma metodología, han obtenido unos valores de prevalencia que difieren según la población de estudio.

Lopez y cols. (2005), en sujetos chilenos diagnosticados de periodontitis agresiva, obtuvieron un rango de prevalencia de *A.actinomycetemcomitans* entre 44% y 50%.

Más recientemente, Gajardo y cols. (2005), encontraron valores de prevalencia, en una población similar a la anterior, de 16% a 33%.

En otras poblaciones, se han reportado valores tales del 55% en China (Mombelli y cols. 1998) y 100% en Panamá (Eisenmann y cols. 1983).

Utilizando PCR, autores como Cortelli y cols. (2005) calcularon valores de prevalencia de *A.actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis agresiva de 72% en una población brasileña, 74% en Korea (Lee y cols.2003) y 100% en una población marroquí (Rylev y cols.2011).

En el grupo de pacientes incluidos en el presente estudio diagnosticados de periodontitis crónica, la prevalencia de *A.actinomycetemcomitans* es del 25%.

Con una metodología basada en el cultivo, se observaron valores similares en una población holandesa (23.3%) e inferiores en una población española (3.2%) (Sanz y cols. 2000).



En el presente estudio también se ha determinado la distribución de los serotipos de *A.actinomycetemcomitans* en una población marroquí, en la que existe una clara tendencia hacia la mono infección por el serotipo b.

Otros estudios realizados coinciden en encontrar una predominancia de la mono infección por el serotipo b en una población alemana (Kim y cols. 2009), así como en sujetos jóvenes con periodontitis en Estados Unidos (Zambon y cols.1983, Asikainen y cols.1991) y del serotipo c en una población japonesa (Kim y cols. 2009, Mombelli y cols. 1999).

Sin embargo, otros estudios han encontrado valores similares de mono infección por serotipos distintos, como es el caso de los serotipos a, b y c en Korea (Chung y cols. 1999) o en Finlandia (Asikainen y cols.1995). Nuestro grupo también ha encontrado una distribución similar en pacientes españoles con diagnóstico de periodontitis (Pousa y cols.2009, Mínguez y cols.2010).

En el presente estudio, el 4.8% de las muestras mostró coinfección por dos serotipos distintos, b y c. Otros estudios han encontrado valores de coinfección en el 16% de las muestras, especialmente de los serotipos c y e (Mombelli y cols.1999). Se han encontrado coinfecciones incluso con tres serotipos distintos (Yang y cols. 2004). Estudios como el de Kim y cols (2009), no ha encontrado ningún caso de coinfección en una comparación de dos poblaciones, alemana y japonesa.

Este estudio encontró proporciones mayores de serotipo b en pacientes que sufrían periodontitis agresiva que aquellos con periodontitis crónica; por el contrario, en nuestro estudio, existía una distribución similar de este serotipo entre los pacientes con periodontitis agresiva y crónica. En general, parece que el serotipo b se relaciona más con pacientes con periodontitis, y el c se encuentra más frecuentemente en pacientes con salud periodontal (Zambon y cols. 1983, Asikainen y cols. 1991, Yamamoto y cols. 1997).



La cepa altamente leucotóxica (JP2) de *A.actinomycetemcomitans* sólo se ha encontrado en cinco aislados (12.19%) pertenecientes a dos pacientes con periodontitis agresiva. Nuestro valor de prevalencia del clon JP2 es menor respecto a la que cabe esperar en esta población marroquí, de acuerdo al estudio de Haubek y cols.(2001), en el que la prevalencia de la cepa altamente leucotóxica fue de 78.9% en un grupo de pacientes con diagnóstico de periodontitis de comienzo temprano en una población marroquí, en la que se constató que este clon está endémicamente presente, y en la que además, existe una fuerte asociación entre dicho clon y las formas de periodontitis que afectan a los adolescentes.

Cabe resaltar que el presente estudio incluye pacientes con periodontitis crónica y que se utiliza el cultivo como el primer método de detección, lo cual disminuye notablemente el límite de identificación de las bacterias de la muestra. La PCR constituye un método altamente específico y más sensible que el cultivo a la hora de detectar la presencia de *A.actinomycetemcomitans* (Poulsen y cols. 2003).

Además, Haubek y cols. (2009), consideran que existen otras limitaciones para la detección de la delección como es la distribución desigual de la cepa JP2 en las bolsas periodontales, además la dificultad de las puntas de papel para alcanzar el fondo de la bolsa periodontal, lo que incrementa el número de falsos negativos.

En nuestro caso, estos factores pueden actuar como potenciales limitaciones de este estudio. Teniendo en cuenta dichas limitaciones, las conclusiones de este estudio son:



VI. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de *A.actinomycetemcomitans* en esta población marroquí fue de 42.86%.
2. Existe una tendencia hacia la monoinfección por el serotipo b de *A.actinomycetemcomitans* , siendo la tasa de coinfección por distintos serotipos de 4.8%, en concreto por serotipos b y c.
3. La prevalencia de detección de la delección en la región promotora del gen operón de la leucotoxina de *A.actinomycetemcomitans* fue de 12.19% del total de las muestras.
4. En cuanto al operón CDT, existe una tendencia a la coinfección en un 50% de los pacientes, esto es, la presencia de cepas Cdt positivas y negativas dentro de un mismo paciente.



BIBLIOGRAFIA

- Armitage, GC. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.*4, 1-6.
- Asikainen, S.Chen, C.Slots, J. (1995) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol.*10, 65-8.
- Baehni, P.Tsai, C. (1981) Leucotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch Oral Biol.* 26, 93-99.
- Brogan, JM.Lally , ET.Poulsen , K.Kilian, M. Demuth, DR.(1994) Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun.*62, 501-8.
- Brown, L.Albandar , J.Brunelle, J.(1996) Early onset periodontitis: progression of attachment loss during 6 years. *J Periodontol.* 67, 968-975.
- Bueno, L.Mayer, M.DiRienzo, JM. (1998) Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. *J Periodontol.* 69, 998-1007.
- Cortelli, J.Cortelli, S.Jordan, S.Haraszthy, V.Zambon, J.(2005) Prevalence of periodontal pathogens in Brazilian with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.*32, 860-866.
- Dzink, JL.Tanner, AC.Haffajee, AD.Socransky, SS.(1985) Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 12, 648-59.
- Fine, D.Markowitz, K.Furgarg, D.Fairlie, K.Ferrandiz, J.Nasri, C.McKiernan, M.Gunsolley, J. (2007) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis:longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Journal of Clin Microbiol.*45, 3859-3869.
- Gajardo, M.Silva, N.Gomez, L.Leon, R.Parra, B.Contreras, , A.Gamonal, J.(2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol.*76, 289-294.
- Haffajee, A. D. Socransky, SS. (1994). Microbial etiological agents of destructive



periodontal diseases. *Periodontol* 2000 **5**: 78-111.

Haraszthy, V.Hariharan, G.Tinoco, E.Cortelli, J.Lally, E.Davis, E.Zambon, J.(2000) Evidence for the role of highly leucotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol*.**71**, 912-922.

Haubek, D. Dirienzo, JM. Tinoco, EM. Westergaard, J.López, NJ.Chung, CP. Poulsen, K. Kilian, M.(1997) Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol*. **35**,3037-42.

Haubek, D.Ennibi, OK.Poulsen, K. Vaeth, M.Poulsen, S.Kilian, M.(2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study *Lancet*. **19**, 237-42.

Haubek, D. Ennibi,OK.(2001). Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* **80**, 1580-3.

Haubek, D.Ennibi, OK. Abdellaoui, L.Benzarti, N.Poulsen, S.(2002) Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*.**29**, 657-660.

Haubek, D.Poulsen, K.Kilian, M. (2006) Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect.Immun*.3080-3088.

Henderson, B.Wilson, M.Sharp, L. Ward, J.(2002). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol*.**51**, 1013-1020.

Kaplan, JB. Schreiner, HC. Furgang, D.Fine, DH.(2002) Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol*.**40**, 1181-7.

Kachlany, SC. (2010) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leucotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res*. **89**, 561-570.



Kilian, M.Frandsen, E.Haubek, D.Poulsen, K. (2006) The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontol* 2000.**42**, 158-179.

Kim, T.Frank, P.Eickholz, P.Eick, S.Kim, CK. (2009) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J Periodontol*.**80**, 2020-2027.

Lally, E.Golub, E.Kieba, I.Taichmen, N.Rosenbloom, J.Rosenbloom, J.(1989) Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J Biol Chem*.**264**, 15451-6.

Lara-Tejero, M.Galán, JE. (2000) A Bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like preotein. *Scienc*.**290**, 354-357.

Lee, J.Choi, B.Yoo, Y.Choi, S.Cho, S.Chai, J, Kim, C. (2003) Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol*.**74**, 1329-1335.

Levin, L.Baev, V.Lev, R.Stabholz A.Ashkenazi, M. (2006) Aggressive periodontitis among young Israeli army personnel. *J Periodontol*.**77**, 1392-1396.

Lopez, R.Baelum, V. (2003) Classifying periodontitis among adolescents: implications for epidemiological research. *Community Dent Oral Epidemiol*. **31**, 136-143.

Macheleidt, A.Muller, H.Eger, T.Putzker, M.Fuhrmann, A.Zoller, L. (1999). Absence of an especially toxic clone among isolates of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* recovered from army recruits. *Clin Oral Investig*.**3**, 161-167.

Mínguez M.Pousa, X.Blasi, A. Herrera, D.Sanz, M. (2010) Characterization and Serotype distribution of *A.actinomycetemcomitans* In Spanish periodontal Patients. *J Dent Res*.**89**,Spec Iss.B, 39.

Mombelli, A.Gmür, R.Lang, NP.Corbet, E.Frey, J.(1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults.*J Clin Periodontol*.**26**, 505-510.

Pousa X.Blasi, A. Zurbriggen, M.Sanchez, M.Leon, R.Herrera, D.Sanz, M. (2009) Characterization and serotype distribution of *A.actinomycetemcomitans* detected in a population of periodontitis patients in Spain. *J Clin Periodontol*.**36**,Suppl.9, 45.

Roman-Torres, GC. Aquino, DR. Cortelli, SC. Franco, GC. Guimaraes dos Santos, J. Corraini, P.Holzhausen, M.Gonçalvez, M. Gomez, RS.Cortelli, JR. (2010).Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter*



actinomycetemcomitans in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Arch Oral Bio.* **55**, 242-248.

Rylev, M. Kilian, M. (2008) Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol.* **35**, 346-361.

Sanz, M. van Winkelhoff, A. Herrera, D. Iemijn-Kippuw, N. Simon, R. Winkel, E. (2000) Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Scien.* **108**, 383-392.

Slots, J. (1999) Update on *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *J Int Acad Periodontol.* **1**, 121-6.

Suzuki, N. Nakano, Y. Yoshida, Y. Ikeda, D. Koga, T. (2001) Identification of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* **39**, 2002-2005.

Tan, K.S. Woo, C.H. Ong, G. Song, K.P. (2001) Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *J Clin Periodontol.* **28**, 886-90.

Timmerman M. Van der Weijden, G. Arief, M. Armand, S. Abbas, F. Winkel, E. van Winkelhoff A. Van d.V. (2001) Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Clinical and microbiological baseline data. *J Clin Periodontol.* **25**, 215-224.

Tonetti, M. Mombelli, A. (1999). Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontology.* **4**, 39-53.

Van der Reijden, W. Bosch-Tijhof, C.J. Van der Velden, U. van Winkelhoff, A.J. (2008) Java Project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol.* **35**, 487-492.

Van der Velden, U. Abbas, F. Armand, S. Loos, B. Timmerman, M. Van der Weijden, G. van Winkelhoff, A. Winkel, E. (2006) Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol.* **33**, 540-548.



Yamamoto, M.Nishihara, T.Koseki, T.He, T.Yamato, K.Zhang, Y.Nakashima, K.Oda, S.Ishikawa, I.(1997) Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in Japanese patients with periodontitis.J Periodontol Res.**32**, 676-681.

Yoshida, Y.Suzuki, N.Nakano, Y.Shibuya, K.Ogawa, Y.Koga, T. (2003) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol and Immunol*.**18**, 135-139.

Zambon, J. (1985) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease.*J Clin Periodontol*.**12**, 1-20.



TABLA 1. Cebadores utilizados para la determinación de las muestras *A.actinomycetemcomitans* positivas y la determinación de los serotipos. pb: pares de bases.

Serotipos	Cebador	Secuencia 5'-3'	Producto de la PCR (pb)	Referencias
16s DNA		AACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC ATGCCAACTTGACGTAAATT	550	Ashimoto y cols. 1996
Serotipo a	P15 P16	TGGGTCATGGGAGGTACTCC GCTAGGAACAAAGCAGCATC	253	Kaplan y cols 2001
Serotipo b	P11	TCTCCACCATTTTTGAGTGG	333	
Serotipo c	P12	GAAACCACTTCTATTTCTCC	268	
Serotipo f	P13	CCTTTATCAATCCAGACAGC	232	
	P14	AAAAGTTCTCATCGGGAATG		
Serotipo d	P17	TGGAACGGGTATGGGAACGG	411	
	P18	GGATGCTCATCTAGCCATG		
Serotipo e	P19	ATTCCAGCCTTTTGGTTCTC	311	
	P20	TGGTCTGCGTTGTAGGTTGG		

TABLA 2. Cebadores utilizados para la identificación del operón Cdt.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Gen	Tamaño del producto de la PCR (pb)
Cdt A ₁	ATGAAGAAGTTTTTACCTGGTC	CdtA	669
Cdt A ₂	TAATTAAGGGGTCAAGCTTCT		
Cdt B ₁	TGCAATCCCATTTCGAATTA	CdtB	851
Cdt B ₂	TTAGCGATCACGAACAAAAC		
Cdt C ₁	CTTTAGGTACATGTATTGAA	CdtC	560



TABLA 3. Datos clínicos de los pacientes marroquíes positivos para *A.actinomycetemcomitans*.

	Profundidad de sondaje (mm)	Recesión (mm)	Sangrado	Placa	Supuración
Media	6.32	0.98	0.83	0.81	0.15
Desviación estándar	1.79	0.86	0.26	0.34	0.17
Máximo	9.75	2.75	1	1	0.5
Mínimo	4	0	0.25	0	0

TABLA 4. Datos microbiológicos de los pacientes marroquíes positivos para *A.actinomycetemcomitans*. UFC: unidades formadoras de colonias. ml: mililitros.

	Media (UFC/ml)	Desviación estándar (UFC/ml)	Máximo (UFC/ml)	Mínimo (UFC/ml)	Prevalencia (%)
TOTAL ANAEROBIOS	2.0×10^7	1.49×10^7	5.06×10^7	3.76×10^6	
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	1.64×10^4	2.0×10^4	8.25×10^4	2.24×10^2	100
<i>P.gingivalis</i>	4.42×10^6	6.25×10^6	2.35×10^7	0	93.8
<i>P.intermedia</i>	6.25×10^6	1.05×10^7	3.62×10^7	0	87.5
<i>T.forsythia</i>	4.87×10^5	1.32×10^6	5.21×10^6	0	37.5
<i>P.micra</i>	3.06×10^5	6.60×10^5	2.51×10^6	0	43.8
<i>C.rectus</i>	4.13×10^3	1.65×10^4	6.60×10^4	0	6.3
<i>F.nucleatum</i>	2.23×10^5	1.54×10^5	5.28×10^5	4.62×10^4	100
<i>Capnocytophaga</i>	0	0	0	0	0
<i>E.corrodens</i>	1.08×10^4	2.61×10^4	8.58×10^4	0	25
<i>Eubacterium</i>	0	0	0	0	0
<i>Otros</i>	0	0	0	0	0

TABLA 5. Porcentaje de recuentos de cada bacteria frente al total de recuentos de anaerobios.

	Media porcentajes	Desviación estándar	Máximo	Mínimo
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	0.22	0.54	2.19	0
<i>P.gingivalis</i>	18.44	19.27	67.42	0
<i>P.intermedia</i>	19.38	24.64	71.67	0
<i>T.forsythia</i>	1.58	3.04	11.40	0
<i>P.micra</i>	1.56	2.83	9.84	0
<i>C.rectus</i>	0.05	0.22	0.86	0
<i>F.nucleatum</i>	2.02	3.35	14.04	0.35
<i>Capnocytophaga</i>	0.15	0.36	1.26	0
<i>E.corrodens</i>	0.51	1.62	6.5	0
<i>Eubacterium</i>	0	0	0	0



TABLA 6. Análisis por paciente de la distribución de la delección del gen operón de la leucotoxina.

Gen Ltx C	% (N)
Delección Ltx C (producto PCR 504 pares de bases)	12.5 % (2)
Ausencia de la delección (producto PCR 1034 pares de bases)	87.5% (14)

TABLA 7. Análisis por cepa de la caracterización de las muestras según la presencia del operón CDT.

Operón CDT	% (N)
Presencia del gen CDT (producto de la PCR de 2016 pares de bases)	68'29% (28)
Ausencia del gen CDT (producto de la PCR menor de 2016 pares de bases)	31'71% (13)

TABLA 8. Análisis por paciente de la caracterización de las muestras según la presencia del operón CDT.

Operón CDT	Número de pacientes (%)	
	Presencia gen CDT	Ausencia gen CDT
Mono infección	6	2
Coinfección	8	

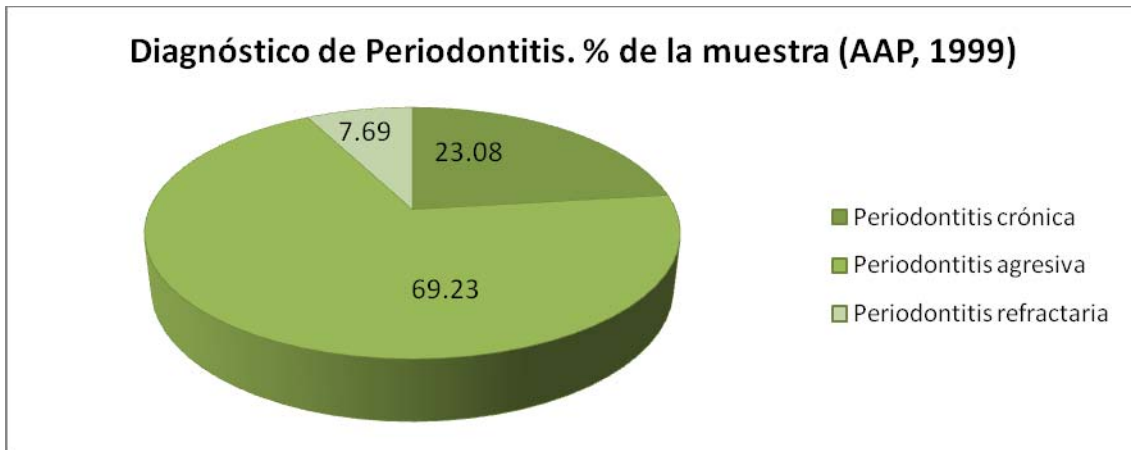


GRÁFICO 1. Distribución de tipos de periodontitis en la muestra de pacientes *A.actinomycetemcomitans* positivos. AAP: Asociación Americana de Periodoncia.

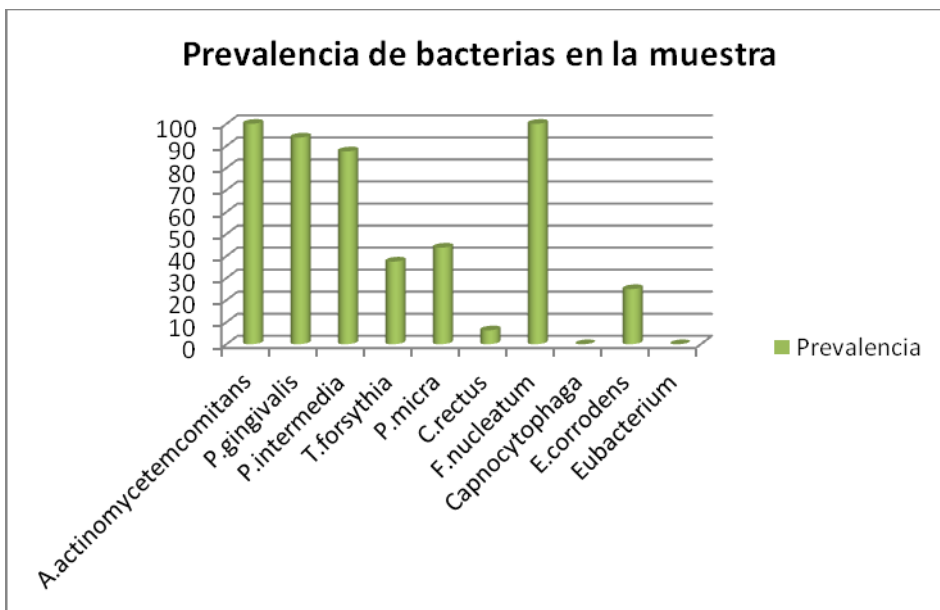


GRÁFICO 2. Prevalencia de detección de las distintas bacterias en los pacientes marroquíes positivos para *A.actinomycetemcomitans*.

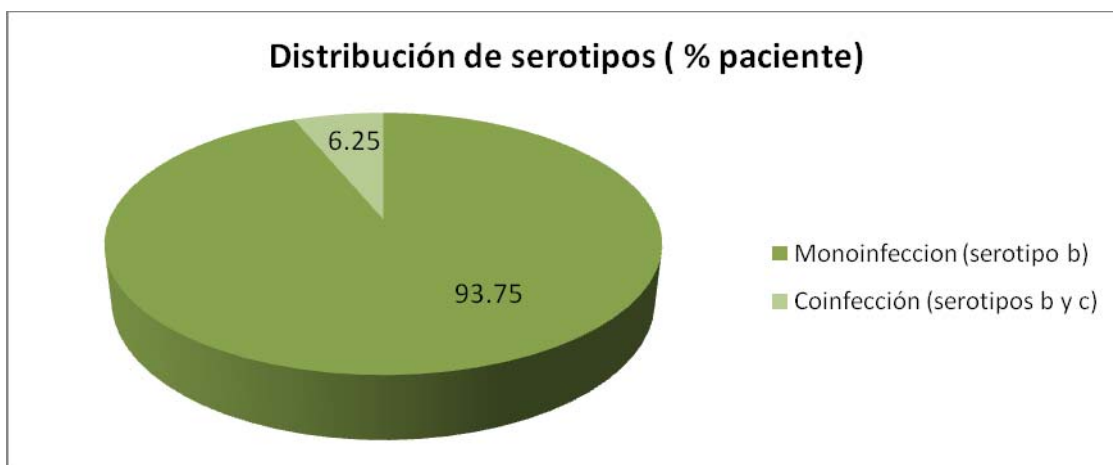


GRÁFICO 3. Análisis de la distribución de serotipos de *A.actinomycetemcomitans* por paciente.

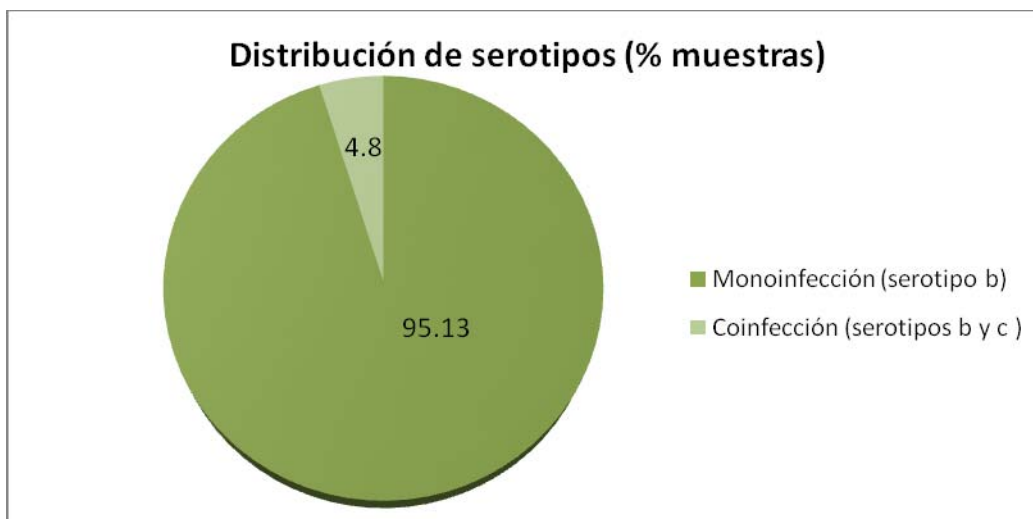


GRÁFICO 4. Distribución de serotipos en las 41 cepas de los pacientes positivos para *A.actinomycetemcomitans*.

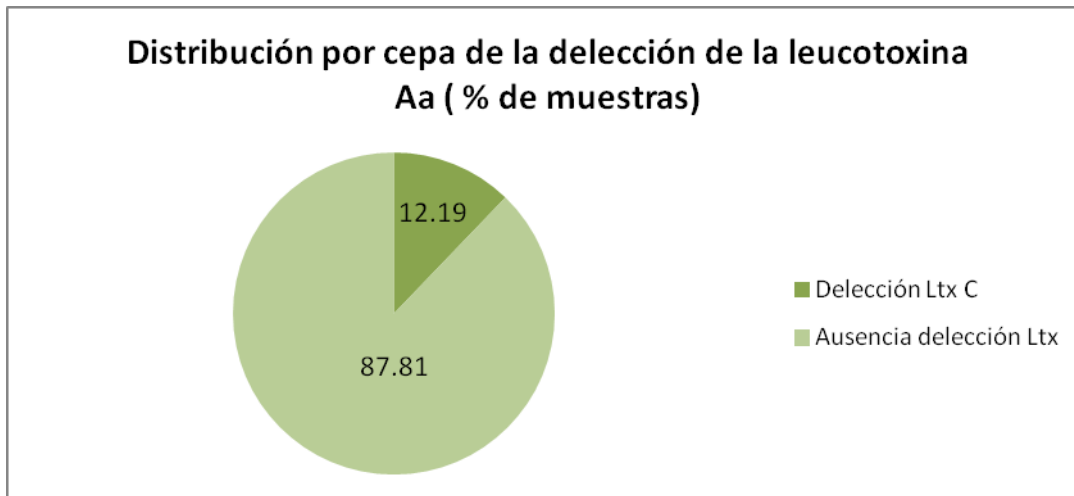


GRÁFICO 5. Análisis por cepa de la distribución de la delección del gen operón de la leucotoxina.

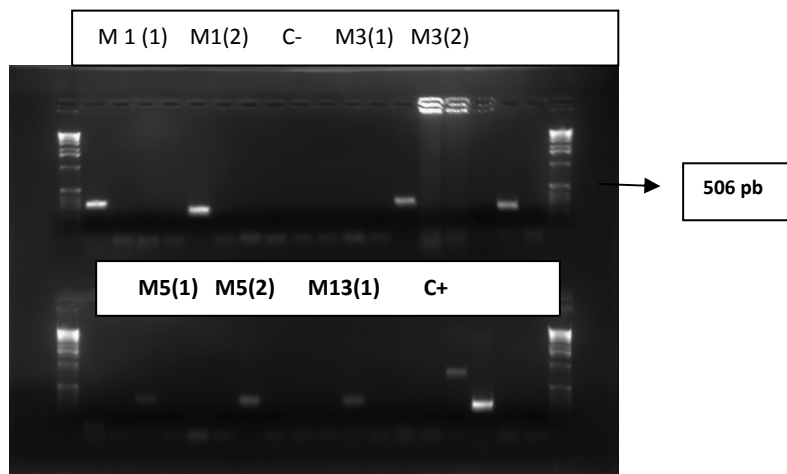


FIGURA 1. Serotipificación mediante PCR de las muestras M1, M3, M5 y M13 de *A.actinomycetemcomitans*. Todos pertenecientes a serotipo b. Marcador de tamaño molecular: 1kb.

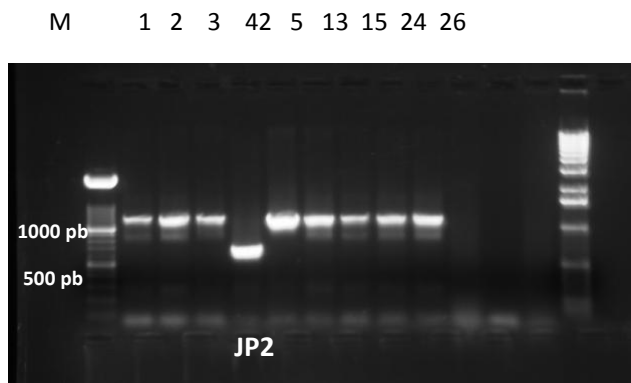


FIGURA 2. Amplificación del fragmento de 1034 y 530 pares de bases correspondiente a la ausencia y presencia de la delección del gen operon de la leucotoxina de *A actinomycetemcomitans* en las muestras M1, M2, M3, M42, M5, M13, M15, M24 Y M26. Marcador peso molecular: 100 bp.

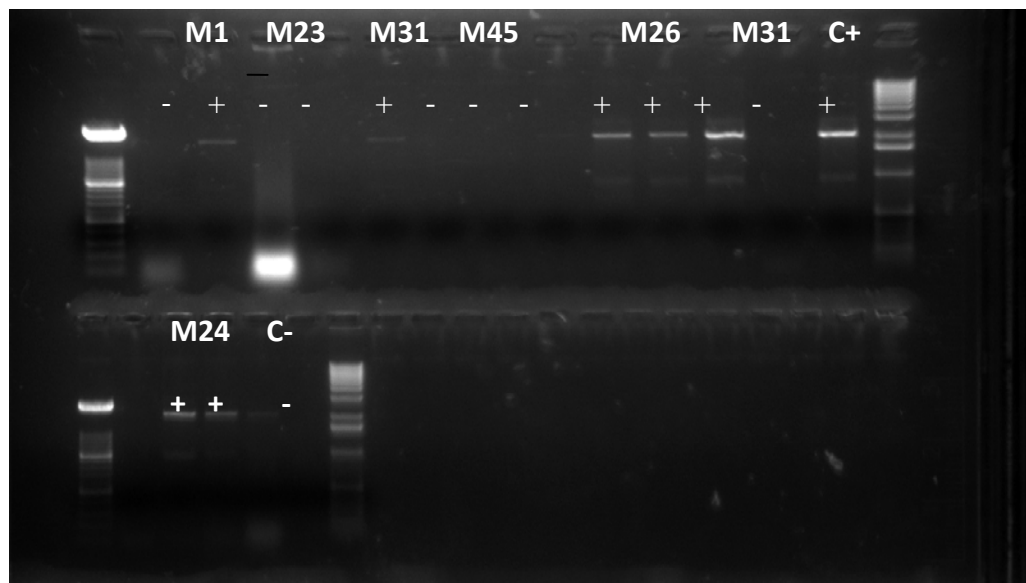


FIGURA 3. Amplificación del fragmento de 2016 pares de bases correspondiente a la presencia del operón CDT de las muestras M1, M23, M31, M45, M26, M31 Y M24. C+: control positivo. C-: control negativo.