



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**GENES QUE CODIFICAN PARA LA RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN CEPAS PERIODONTALES DE
*Escherichia coli***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JOSÉ MANUEL VÁZQUEZ MEDINA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS**

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2021



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.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Mecanismos de virulencia.....	9
Ingreso.....	9
Adherencia	9
Cápsula	9
Mecanismos de acción de los antibióticos.....	10
Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos.....	11
Betalactámicos	15
Quinolonas	15
Tetraciclinas	16
Cloranfenicol	16
Sulfonamidas.....	17
Trimetoprim	17
Aminoglucósidos	17
JUSTIFICACIÓN	20
ANTECEDENTES	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Obtención de las muestras.....	23
Siembra de las muestras	23
Extracción del DNA de <i>E. coli</i> periodontal.....	23
Identificación de <i>E. coli</i> por PCR convencional	23
Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de Agarosa	27
RESULTADOS	27
Pacientes analizados	27
Identificación de las cepas de <i>E. coli</i> periodontal	29
Frecuencia de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de <i>E. coli</i>	29
Patrones de asociación de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> periodontal	35

DISCUSIÓN.....	36
Pacientes analizados	36
Identificación de las cepas y enfermedad periodontal.....	37
Genes de resistencia a los antibióticos	38
Tetraciclina	38
Cloranfenicol	39
Betalactámicos	39
Trimetoprim	39
Estreptomina	40
Gentamicina	40
Sulfonamida	40
Quinolonas	41
Elementos genéticos móviles: plásmidos, transposones e integrones.....	41
Patrones de asociación de genes de resistencia a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> periodontal ..	42
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS.....	44

DEDICATORIA

A mi compañera Mariana que, con su apoyo incondicional y compañía, me motiva a ser mejor y superarme día con día.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme profesionalmente y por permitirme con gran orgullo ser parte de una de las mejores universidades.

A mi directora de tesis Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por abrirme las puertas de su laboratorio y dirigir mi trabajo de tesis, por aportarme sus conocimientos y permitirme culminar la última fase de mis estudios profesionales.

Al Dr. Eric Monroy Pérez por guiarme, aportarme sus conocimientos y ser parte importantísima de este trabajo de tesis.

Gracias a los sinodales, Dr. Eric Monroy Pérez, Dr. Felipe Vaca Paniagua, M. en C. David Segura Cobos y Biol. Susana Esther González Almazán.

A mis padres por su apoyo incondicional, por su motivación y por creer en mí.

RESUMEN

La enfermedad periodontal (EP) es una infección inflamatoria, localizada en la encía y en las estructuras de soporte del diente, con el tiempo puede desencadenar el aflojamiento y la pérdida de la pieza dental. La EP es ocasionada por bacterias Gramnegativas anaerobias, así como también por otras bacterias, entre ellas *E. coli*. En los últimos años, el tratamiento de las infecciones periodontales por *E. coli* se ha complicado debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a los antibióticos. El objetivo de este trabajo fue detectar la frecuencia de los genes que codifican para resistencia a antibióticos en cien cepas periodontales de *E. coli*. Las cepas fueron identificadas por PCR mediante la amplificación del gen ribosomal 16S RNA y los genes de resistencia a antibióticos por PCR convencional. Los genes de resistencia más frecuentes fueron *tet(A)* (tetraciclina) con el 47% (n=47), *dfrA1* (trimetoprim) con el 32% (n=32), *aac(3)-IV* (aminoglucósidos) con el 30% (n=30), seguido de *aadA1* (estreptomicina) y *sul-1* (sulfametoxazol) con el 28% (n=28), en cada caso, *tet(B)* con el 26% (n=26), *cat1* (cloranfenicol) con el 20% (n=20), *CITM* (betalactamasas) con el 14% (n=14), y *cmlA* (cloranfenicol) con el 1% (n=1), mientras que *blaSHV* no se detectó en ninguna cepa.

La distribución del genotipo de resistencia a diferentes grupos de antibióticos identificado en las cepas de *E. coli*, además de los mecanismos moleculares para los que codifican, podrían ser un factor de riesgo importante para la agudeza y/o cronicidad de la enfermedad periodontal de los pacientes estudiados.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) es un proceso infeccioso del tejido de la encía y estructuras de soporte adyacentes (Escudero-Castaño, 2008). Es considerada como un problema de salud pública a nivel mundial, pues ocupa los primeros lugares en enfermedades que comprometen la salud. Se estima que más del 50% de la población adulta a nivel mundial presenta alguna EP (Alvear *et al.*, 2010)

El origen de las enfermedades periodontales es variado, se pueden adquirir por alteraciones en factores sistémicos (sistema endócrino, discrasias sanguíneas), mal nutrición (déficit de ácido ascórbico), virus, hongos, traumatismos (físicos o químicos), factores genéticos como la fibromatosis gingival hereditaria y por alteraciones por bacterias específicas. Dentro de ésta, se reconocen a las infecciones bacterianas de naturaleza endógena, causadas por bacterias comensales en la placa supra y subgingival. No obstante, las infecciones exógenas, o verdaderas infecciones periodontales son causadas por bacterias no habituales en la placa, al igual que las sobre infecciones periodontales, que son causadas por enterobacterias (Farías, 2012).

La enfermedad periodontal se clasifica en dos categorías: gingivitis y periodontitis (Matesanz *et al.*, 2008).

Se le llama gingivitis, cuando la enfermedad presenta síntomas de inflamación, enrojecimiento y sangrado de la encía, sin pérdida de inserción del tejido conectivo. En esta etapa, el proceso de inflamación es reversible. A su vez, la gingivitis se clasifica con base en el origen de la infección y la localización (Armitage, 2000).

En cuanto al origen de la gingivitis, se clasifican como infecciones inducidas por placa bacteriana y no inducidas por placa bacteriana. La localización se refiere a las zonas gingivales que presentan sangrado e inflamación; la gingivitis localizada se define con un 10-30% de zonas con sangrado, y la gingivitis generalizada cuando se presenta en más del 30% de la encía (Echeverría *et al.*, 2018).

Por otro lado, la periodontitis se caracteriza por la presencia de inflamación gingival y la migración de la inserción del epitelio a las superficies radiculares, acompañado por la pérdida del tejido conectivo y el hueso alveolar (Matesanz *et al.*, 2008). La clasificación de la periodontitis se da en función de la extensión y severidad de la infección. La extensión se refiere al área gingival que se ha infectado y va desde localizada (con menos del 30% de localizaciones afectadas) y generalizada (más de 30%). En cuanto a la severidad, se

refiere a la pérdida del tejido de inserción. La periodontitis leve, presenta una pérdida del tejido de inserción que va desde uno a dos milímetros; la periodontitis moderada presenta una pérdida de tres a cuatro milímetros y la periodontitis severa presenta una pérdida de tejido de inserción mayor a cinco milímetros (Escudero-Castaño, 2008).

Las EP adquiridas por alteraciones bacterianas son causadas por microorganismos aerobios y anaerobios facultativos (Basconces-Martinez, 2005), que han colonizado el área del tejido supra y subgingival, formando una placa que se adhiere a la superficie dura de las piezas dentales, al tejido conectivo, ligamento periodontal, hueso alveolar y al epitelio crevicular (Cruz *et al.*, 2014).

Se ha descrito que las especies presentes en la placa bacteriana subgingival varían entre poblaciones y depende de la distribución geográfica, etnias e incluso el nivel socioeconómico (Herrera *et al.*, 2008). A nivel mundial, son más de 700 las especies bacterianas documentadas, relacionadas a infecciones periodontales (Alvear, 2010).

Entre las especies bacterianas causantes de infecciones periodontales endógenas, se reconocen a *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas intermedia*, *P. melaninogenica* y *Campylobacter sputorum* como las especies más comunes. En cuanto a las infecciones exógenas, *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *P. gingivalis* son reconocidas como bacterias frecuentes de la placa subgingival. Por último, las sobreinfecciones periodontales son causadas por enterobacterias, principalmente *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* (Haffaje y Socransky, 1994; Farias, 2012).

E. coli es un bacilo Gramnegativo, móvil, que mide 0.5 micras de ancho y 3 micras de largo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria forma parte de la microbiota natural intestinal del hombre. Sin embargo, hay cepas potencialmente patógenas que provocan diferentes cuadros clínicos. Bioquímicamente se caracteriza por producir indol, fermentan la glucosa, lactosa y sacarosa produciendo Ac. pirúvico y gas, además de oxidar el nitrato a nitrito (Rodríguez, 2012).

La patogenicidad de *E. coli* se debe que posee un gran número de mecanismos de virulencia, que le confieren una alta protección específica ante la respuesta inmune del hospedero (Tenover, 2006)

Mecanismos de virulencia

Los mecanismos de virulencia son todas aquellas moléculas producidas por un patógeno que le confieren efectividad para entrar, adherirse, colonizar, crecer, obtener nutrientes y evadir la respuesta inmune del hospedero (Cárdenas *et al.*, 2014).

Ingreso

En la fase temprana de infección, las bacterias ingresan al organismo del hospedero por diferentes vías de internalización llamadas comúnmente “puertas de entrada”. Estas “puertas de entrada” pueden ser mucosas, piel y los depósitos que se encuentran debajo de ellas. Son altamente específicas, debido a que cada especie bacteriana requiere de diferentes condiciones para colonizar los tejidos del hospedero (Meylan *et al.*, 2006).

Adherencia

Una vez dentro del hospedero, la bacteria se adhiere a sus células mediante la producción de adhesinas, que son proteínas que se unen específicamente a receptores complementarios en ciertos tejidos del hospedero. Entre los genes que codifican para adhesinas se encuentran: *fim* (fimbria tipo 1), *afal* (adhesina fimbrial I) y *papC* (pilus asociado a pielonefritis). Además de la adhesión a las células de hospedero, estos genes también ayudan a la formación de biopelículas, las cuales protegen a la bacteria contra los desinfectantes y antibióticos. Por otro lado, la presencia de flagelos ayuda a la locomoción de la bacteria y son importantes factores de virulencia para invadir otras regiones del hospedero (Cárdenas *et al.*, 2014)

Cápsula

Otro factor de virulencia es la formación de la cápsula, un polisacárido que envuelve a la bacteria y lo protege de la respuesta inmune del hospedero, principalmente del proceso de inflamación, puesto que esta es la señal de activación de los macrófagos para realizar fagocitosis. Ésta es expresada por los genes *KpsMT* y *ompT* o el gen *iss* (supervivencia al suero) evade la respuesta inmune del hospedero (Cárdenas *et al.*, 2014).

En la actualidad, los tratamientos para pacientes con enfermedad periodontal se basan principalmente en el uso de antibióticos, los cuales penetran en los tejidos y bolsas periodontales llegando hasta los microorganismos (Cruz *et al.*, 2010).

Mecanismos de acción de los antibióticos

Una vez en contacto con la bacteria, los antibióticos trabajan mediante cinco principales mecanismos de acción

Inhibición de la síntesis de la pared celular: Principalmente los beta lactámicos (ampicilina, penicilina y cefalosporinas), que se unen a las transpeptidasas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) responsables del entrecruzamiento de los componentes de la pared celular (ácidos teicoicos y teicurónicos) (Benton *et al.*, 2007).

Inhibición de la síntesis de proteínas por modificación enzimática. Trabajan de diferente manera según el antibiótico. El cloranfenicol impide la síntesis de proteínas, inhibiendo la elongación de la cadena peptídica, uniéndose de manera reversible al centro de la peptidil transferasa del ribosoma 70S (Schwarz *et al.*, 2009). Las tetraciclinas se acoplan a la subunidad ribosomal 30s, interfiriendo con el aminoacil tRNA, impidiendo la elongación de las cadenas polipeptídicas nacientes (Leach, *et al.*, 2007).

De igual manera, los aminoglucósidos impiden la síntesis de proteínas uniéndose de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo en la lectura del mRNA, por lo que no se inicia la traducción. La estreptomycin se une a los nucleótidos 13, 256, 915 y 1490 del rRNA y a la proteína 12S, en el caso de la gentamicina se une a la subunidad 30S del ribosoma. La mayoría de los aminoglucósidos están diseñados para unirse al sitio A y cambiar la estructura conformacional del RNA 16S (Grünbaum, 2011).

Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos: Las quinolonas inhiben la síntesis de DNA interfiriendo la acción de la topoisomerasa de tipo II (Gramnegativas), topoisomerasa IV (Grampositivas) y la DNA girasa causando la ruptura de la cadena de DNA durante la replicación (Mosquito *et al.*, 2011). En bacterias Gramnegativas, la DNA girasa es el blanco principal y la topoisomerasa IV es el blanco secundario. La DNA girasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades, dos tipo A y dos tipo B, codificadas por los genes *gyrA*) y *gyrB* respectivamente, y es la encargada de catalizar el super enrollamiento negativo del DNA. La topoisomerasa IV, blanco principal en las bacterias Grampositivas, consta de cuatro subunidades; dos subunidades C y dos E, codificadas por los genes *parC* y *parE* (Mosquito *et al.*, 2011).

Desorganización de la pared celular: Las polimixinas (sulfato de colistina y colistimetato de sodio) se unen a la membrana citoplasmática de las bacterias Grampositivas o en la

membrana interna de las Gramnegativas, aumentando la permeabilidad de las membranas, causando su rompimiento (Straus y Hancock, 2006).

Inhibición de rutas metabólicas: Bloquean pasos clave en rutas metabólicas. Las sulfonamidas interfieren en la biosíntesis de dihidropteroato sintasa (*suI*), enzima clave para la síntesis del ácido fólico. De igual manera, el trimetoprim actúa inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa (*dhfr*), enzima importante en la enzima del ácido fólico (Ho *et al.*, 2009).

Sin embargo, en los últimos años el tratamiento de las infecciones se ha complicado debido a que las bacterias se han seleccionado como resistentes a los antibióticos (Ardilla, 2010).

Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos

El fenotipo de resistencia bacteriana al efecto bacteriostático y bactericida de los antibióticos es un proceso evolutivo natural, que se ha seleccionado bajo la presión de los productos antibacterianos, antisépticos e incluso a los desinfectantes. En los últimos años, este fenómeno se ha visto acelerado por el uso indiscriminado de antibióticos, además, que las bacterias poseen mecanismos moleculares transmisibles horizontalmente, lo que dificulta la investigación y la elaboración de nuevos antibióticos a nivel mundial para nuevas bacterias patógenas para el humano (Oromí, 2000).

El origen de la resistencia a los antibióticos puede ser natural, provenir de mutaciones o bien, originarse por la transferencia de genes. Cuando todas las cepas pertenecientes a una misma especie bacteriana tienen el fenotipo resistente, se denomina resistencia natural, como es el caso de algunas bacterias Gramnegativas, enterobacterias y micoplasmas. En el caso de la resistencia adquirida, ésta sólo aparece en algunas cepas de una especie que es normalmente sensible, que es la forma más frecuente de resistencia y puede ser adquirida por mutaciones o por la adquisición de nuevos genes codificantes para mecanismos moleculares que confieren resistencia a los antibióticos. La resistencia por mutaciones es poco frecuente y afecta sólo a un pequeño porcentaje de cepas aisladas *in vitro* (del 1 al 2%). Este fenómeno aparece espontáneamente con una frecuencia de 10^{-6} a 10^{-9} , dependiendo de la especie bacteriana y así, el antibiótico ayuda a seleccionar aquellas bacterias mutantes en poblaciones sensibles a éste (Mosquito *et al.*, 2011).

A pesar de la importancia de estos fenómenos, es necesario precisar que la mayoría de los casos en que se reporta resistencia bacteriana, alrededor del 80% de los estudios, provienen de elementos genéticos exógenos (Cárdenas *et al.*, 2014).

El mecanismo de transferencia de genes entre bacterias permite la rápida y extensa difusión de la información genética entre bacterias. Dicha transferencia se produce tanto en bacterias Grampositivas y Gramnegativas y se denomina transferencia horizontal, debido a que se da con independencia de todo mecanismo de reproducción. Cuando el fenómeno se presenta durante la reproducción bacteriana, se denomina transferencia vertical. Los mecanismos que permiten esta transferencia horizontal genética son: la transducción, transformación y conjugación (Mosquito *et al.*, 2011).

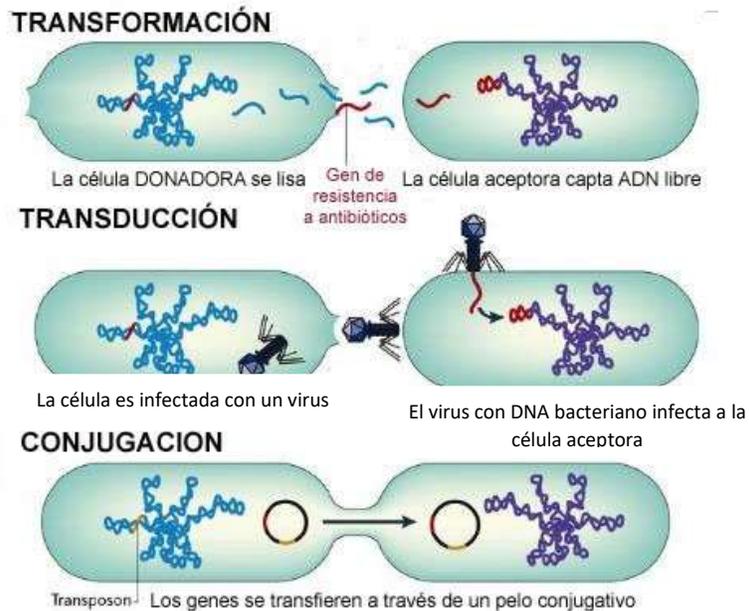


Fig. 1. Mecanismos de transferencia horizontal de genes (Oromí, 2000).

En la transducción, el vector es un virus bacteriano, es decir, un bacteriófago que es capaz de transferir un fragmento de DNA, de una bacteria a otra. Al entrar a la bacteria, induce una nucleasa que fragmenta el cromosoma bacteriano a la vez que se forma el DNA vírico y sus proteínas de envoltura. Algunas de estas proteínas incluyen DNA fragmentado de otras bacterias que, al infectar a un nuevo hospedero, puede introducir nuevos genes, entre ellos los causantes de la resistencia bacteriana a los antibióticos. La transducción es un mecanismo de transferencia muy eficaz, pero debido a la especificidad de la relación virus-bacteria, sólo está limitada a intercambios entre microorganismos filogenéticamente próximos. (Gillings, 2014).

Por su parte, la transformación permite la adquisición y la incorporación de DNA exógeno desnudo del medio, es otras palabras, el fragmento de DNA se encuentra en el medio extracelular y es captado por la bacteria. La procedencia de estos fragmentos es bacteriana,

y es el resultado de la desorganización parcial o total de la membrana de bacterias que ya han muerto. Este mecanismo de transferencia horizontal de genes es muy común y se ha descrito con más frecuencia en bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y bacterias Gramnegativas y permite la mezcla de la información genética entre bacterias de diferentes grupos filogenéticos y permite la formación de nuevos genes muy resistentes a los antibióticos (Gillings, 2014).

El tercer y último mecanismo de transferencia de información genética de manera horizontal, es la conjugación, que es un proceso durante el cual el DNA se transfiere de una bacteria donante a una bacteria receptora, por medio de un mecanismo que implica un estrecho contacto celular, a través de un pili sexual. Este mecanismo es el responsable casi en su totalidad, de las transferencias horizontales. El mecanismo consiste en la transferencia de uno de los dos filamentos de DNA del cromosoma bacteriano, en donde la bacteria donante aporta una hebra de DNA a la bacteria receptora y conserva la otra mitad de la información, mientras que ambas bacterias sintetizan una cadena complementaria, por lo que al final del proceso, ambas células conservan su cadena doble de DNA, lo que amplía notablemente la resistencia a los antibióticos (Boucher *et al.*, 2007).

Aunque el número de posibilidades en la conjugación es muy grande, la transferencia de genes de resistencia entre dos géneros patógenos será más eficaz conforme menor sea la diferencia genética entre las bacterias implicadas (Omorí, 2000), además, que estos genes de resistencia a los antibióticos, en la mayoría de los casos, se transfieren en estructuras móviles, como son los plásmidos, transposones e integrones (Mosquito *et al.*, 2011).

En el caso de los plásmidos, se trata de fragmentos circulares de DNA de doble cadena con longitud variable que contienen genes de resistencia, entre otros, y poseen la capacidad de replicarse de forma independiente al sistema de duplicación de material genético de la bacteria (Cambray *et al.*, 2010). Una bacteria puede albergar más de un plásmido, y también es posible que un plásmido albergue a más de un gen de resistencia y sea capaz de adquirir sucesivamente varios genes de resistencia nuevos, por lo que un solo plásmido puede determinar la resistencia a cinco o seis familias de antibióticos, de modo que la bacteria puede volverse multirresistente (Boucher *et al.*, 2007).

La capacidad de albergar y adquirir más de un gen de resistencia bacteriana a antibióticos se debe a otro mecanismo transponible presente en el material genético; los transposones (Omorí, 2000). Estos son secuencias de DNA de doble cadena que puede contener varios genes de resistencia a los antibióticos, que pueden ser translocados como unidades

independientes entre un cromosoma y un plásmido, o entre plásmidos de diferentes bacterias (Mosquito *et al.*, 2011). Además, que también poseen la capacidad de recombinarse, lo que les permite el intercambio aleatorio entre secuencias no homólogas de DNA, insertando genes de resistencia al cromosoma, y de forma inversa, incrementando las posibilidades de transferencia de la información genética entre especies filogenéticamente no cercanas (Cárdenas *et al.*, 2014).

Por su parte, los integrones tienen la capacidad de captar genes que determinan la resistencia antibiótica y otras funciones específicas. Están compuestos por tres elementos necesarios para la inserción y expresión de genes exógenos: un fragmento que codifica una integrasa (*intI*), una secuencia *attI*, a la que se unen los genes en cassettes que codifican diferentes mecanismos de resistencia, y dentro de la *intI*, una secuencia promotora (Pc) en el extremo 3', a partir de la cual se transcriben los cassettes de resistencia integrados (Di Conza *et al.*, 2010).

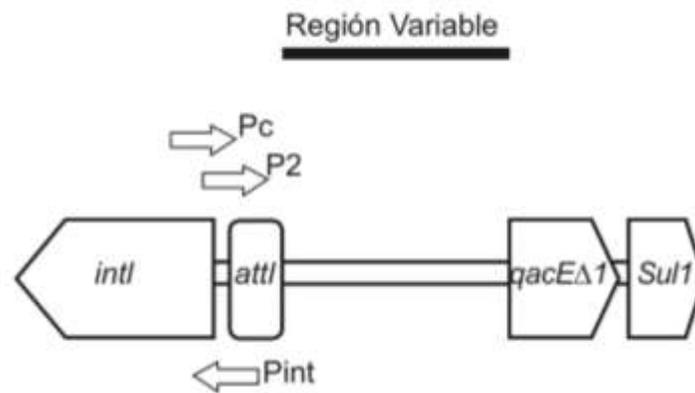


Fig. 2. Estructura de los tres elementos de los integrones. El fragmento que codifica una integrasa *intI*, promotor (Pint), la secuencia *attI*, dentro de la *intI*, en el extremo 3' (Mosquito *et al.*, 2011).

Existen dos tipos de integrones: el grupo I o "integrones móviles", relacionados con la resistencia antibiótica y el grupo II o "superintegrones", que están presentes a nivel cromosómico y no tienen relación directa con la resistencia a los antibióticos. El grupo I se subdivide a su vez en tres grupos, integrones clase 1, clase 2 y clase 3, diferenciados sólo en sus secuencias de integrasas. Entre ellos el integrón más frecuente es el integrón I (*int1*), que contiene más de 100 arreglos de cassettes de resistencia reportados (Di Conza *et al.*, 2010).

Este fenotipo de resistencia a los antibióticos es perceptible a través de la presencia de uno a varios mecanismos moleculares de resistencia a las distintas familias de antibióticos presentes en las bacterias, siendo los mecanismos de inactivación enzimática, como alteraciones en el sitio blanco y la permeabilidad de la membrana, los más relevantes y frecuentes frente a la acción de los antibióticos (Cárdenas *et al.*, 2014).

Betalactámicos

La inactivación de los antibióticos betalactámicos se logra por medio de las betalactamasas, enzimas que hidrolizan el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando al antibiótico antes de que este se una a las transpeptidasas PBPs (Penicillin binding proteins), proteínas de unión a la penicilina (Bonnet, 2004).

Estas betalactamasas constituyen una amplia familia de enzimas, pues cuenta con más de 890 moléculas distintas y se estima que el número de estas seguirá en aumento conforme a los avances en la investigación. Dentro de estas 890 betalactamasas descritas, las familias más comunes dentro de las enterobacterias son: *bla*TEM, *bla*SHV (Beta lactamase Sulfhydryl Heagent Variable), *bla*OXA-1, *bla*CARB y CITM (Citrate Transporter of Mg²⁺) (Mosquito *et al.*, 2011).

Quinolonas

Entre los mecanismos moleculares de resistencia a estos antibióticos, se encuentran las alteraciones puntuales de los blancos de las quinolonas, las bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia por plásmidos. El mecanismo mejor descrito para la resistencia de las quinolonas es por mutaciones puntuales en la DNA Girasa, en donde se cambia el codón 83 y se codifica otro aminoácido, de manera que se modifica la enzima blanco, con lo que se logra una alta resistencia a quinolonas como el ácido nalidíxico. Por otro lado, la resistencia a las fluoroquinolonas, tales como la ciprofloxacina, se relaciona con mutaciones en los genes de *gyrA* (gen que codifican la subunidad A de la DNA girasa), y *parC* (gen que codifica la subunidad C de la Topoisomerasa IV), en donde se cambian de posición los codones 83-87 y 80-84, respectivamente (Poirel *et al.*, 2010).

Otro tipo de mecanismos de resistencia a quinolonas es el relacionado a la transferencia horizontal por plásmidos, como el caso de los genes *qnr* (Quinolone Resistant), que codifican a la familia de proteínas Qnr, proteínas formadas por pentapéptidos repetidos en tándem, que se unen a la DNA girasa y a la topoisomerasa IV, protegiéndola de inhibidores.

Esta proteína es altamente frecuente en enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, principalmente (Chávez *et al.*, 2015)

Tetraciclinas

El mecanismo de resistencia más común hacia este antibiótico es mediante bombas de eflujo codificados por genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* y *tetY*, todos documentados en *E. coli* (Mosquito *et al.*, 2011).

Las bombas de eflujo son serie de proteínas transportadores que son capaces de expulsar un amplio número de sustratos. Están involucradas en la captación de nutrientes esenciales y iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente. Se encuentran clasificadas en cinco grandes familias. Dos de estas corresponden a las superfamilias conocidas como ABC (ATP-binding cassette) y MFS (major facilitator superfamily). Las otras corresponden a las familias RND (resistance-nodulation-cell division), MATE (multidrug and toxic compound extrusion) y SMR (small multidrug resistance). Una diferencia importante entre las distintas familias corresponde a la fuente de energía para expulsar distintos sustratos. Los transportadores de la superfamilia ABC son dependientes de la hidrólisis de ATP para expulsar los distintos compuestos; en cambio, los transportadores de la familia MATE utilizan un gradiente electroquímico otorgado por Na⁺ o H⁺. Por otro lado, las bombas multidrogas pertenecientes a la superfamilia MFS y a las familias RND y SMR utilizan la fuerza protón-motriz para ejercer su función (Opazo *et al.*, 2009).

Las proteínas codificadas por los genes *tetA* y *tetB*, se conforman por una sola proteína de membrana, funcionan intercambiando un protón periplásmico por un complejo Tetraciclina-Mg²⁺ dentro del citoplasma y están relacionadas con elementos genéticos móviles, como operones y transposones (Marchetti *et al.*, 2011).

Sin embargo, no son los únicos mecanismos, puesto se ha documentado la protección ribosomal, codificada por genes *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetW*, *tetQ*, *tetT* y la modificación enzimática, codificada por el gen *tetX* (Chopra, 2001).

Cloranfenicol

El mecanismo más frecuente de resistencia al cloranfenicol es el de inactivación enzimática por acetilación, mediante la acetilación de la acetiltransferasa (CAT), se dividen en dos grupos: tipo A y B, por sus diferencias en la secuencia de aminoácidos. Estas enzimas son

codificadas por los genes *catI* (tipo A) y *catII* (tipo B). Sin embargo, existe otro mecanismo llamado exportación específica, y se refiere a bombas de eflujo específicas para cloranfenicol y florfenicol, existen 3 grupos: E1, E2 y E3, en las que *cmIA* y *floR* son los genes que codifican para estos mecanismos en *E. coli*. (Schwarz *et al.*, 2009)

Sulfonamidas

Los mecanismos de resistencia para las sulfonamidas son adquiridos por genes mutantes, mediante elementos móviles. Se han descrito que los genes *sul1* *sul2* y *sul3* están relacionados con integrones, que codifican formas mutantes de enzimas, como la dihidropteroato sintetasa, intermediario esencial en la síntesis de ácido fólico, que al ser mutante, no puede ser inhibida por el antibiótico (Ho *et al.*, 2009)

Trimetoprim

Al igual que las sulfonamidas, los genes responsables de la resistencia a trimetoprim están relacionados con elementos genéticos móviles, poseedores de genes mutantes como *dfr*, gen que codifica para la enzima dihidrofolato reductasa (*dfr*) y es responsable de la síntesis del ácido fólico, y al ser mutante, el antibiótico es incapaz de reconocer a la enzima y no la inhibe, por lo que el ácido fólico se sintetiza de manera normal (Ho *et al.*, 2009)

Aminoglucósidos

La resistencia a los aminoglucósidos se puede dar de manera natural o adquirida. Una forma de resistencia natural es la que se presenta en bacterias anaerobias estrictas, debido a que los aminoglucósidos entran a la célula por transporte activo, en donde interviene directamente el oxígeno. De igual manera las bacterias anaerobias facultativas son más resistentes cuando están en medios anaerobios. La resistencia adquirida de una bacteria a los aminoglucósidos puede ser debida a tres mecanismos: la disminución de la concentración intracelular del antibiótico, alteraciones en sitios diana y la inactivación enzimática del antibiótico (Grünbaum, 2011)

La disminución de la concentración intracelular del antibiótico se debe principalmente a alteraciones en la permeabilidad de la membrana en el momento de la penetración del antibiótico y también se debe a la presencia de bombas de eflujo activo, como las bombas RND (Resistance Nodulation Division), que tienen por sustrato a compuestos hidrofílicos en cepas de *E. coli*. Estas bombas exportan al antibiótico cuando está dentro de la bacteria y les confieren resistencia cruzada para todos los aminoglucósidos. (Aires *et al.*, 2005).

El segundo mecanismo de resistencia agrupa a las alteraciones en el sitio de unión, o diana, del antibiótico, que pueden ser causadas por mutaciones puntuales o por metilaciones del RNA. Las mutaciones puntuales en el ribosoma son poco comunes, mientras que las metilaciones son más frecuentes en enterobacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae*. La metilación del RNA 16S en posición G1405 se debe a la presencia de algunos de los siguientes genes: *armA*, *rmtA* o *rmtB*. Dicha metilación confiere resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos, en particular a kanamicina, amikacina, tobramicina, gentamicina y netilmicina (Goñi *et al.*, 2004).

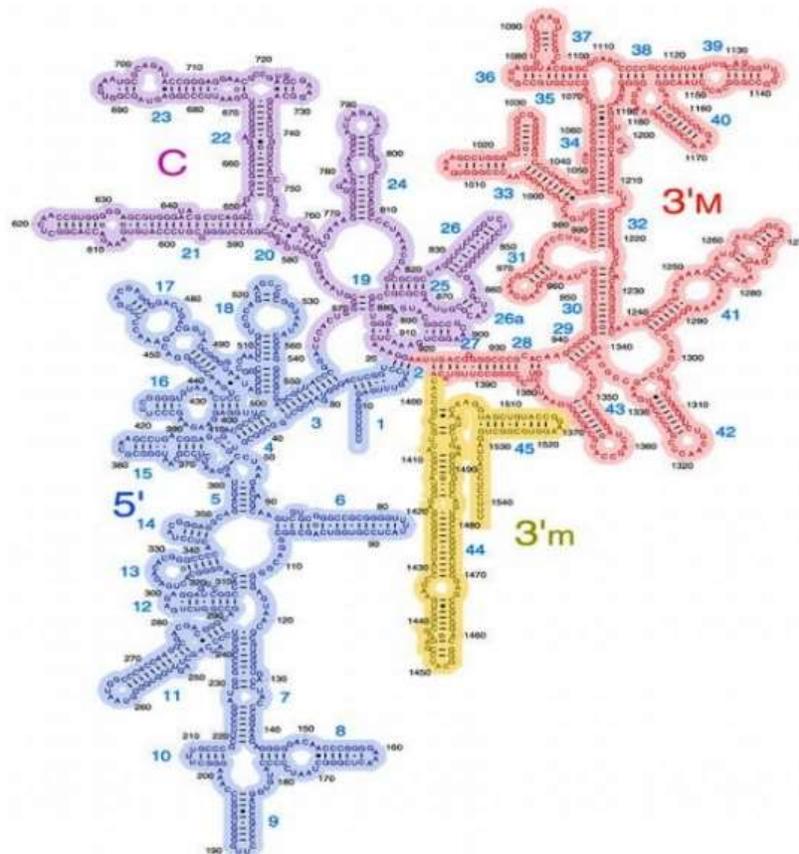


Fig. 3. Estructura del 16S RNA de *E. coli* (Courvalin *et al.*, 2006).

El tercer mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos, y el que representa una mayor importancia clínica, es la modificación enzimática de los aminoglucósidos, por parte de las EMAG: Enzimas Modificadoras de Aminoglucósidos. Las modificaciones enzimáticas por las EMAG, son el mecanismo más frecuente de resistencia a los aminoglucósidos en la familia Enterobacteriaceae y actúan modificando la unión del RNA 16S y el aminoglucósido, por lo que se pierde la efectividad del antibiótico. (Grünbaum, 2011).

Los más de 50 tipos diferentes de EMAG, se agrupan con base en la reacción que catalizan (Goñi *et al.*, 2004):

- N-acetiltransferasas (AAC): catalizan una acetilación, transfiriendo un grupo acetato desde la acetilcoenzima A, a un grupo amino del aminoglucósido.
- O-fosfotransferasas (APH): catalizan una fosforilación, transfiriendo un grupo fosfato desde una molécula de ATP, a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.
- O-nucleotidiltransferasas (ANT): catalizan una nucleotidilación, transfiriendo un nucleótido a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.

La nomenclatura de los genes que codifican para estas enzimas; las acetiltransferasas, las fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas, son designadas *aac*, *aad* y *aph* respectivamente, seguida por la posición del aminoglucósido en la que actúa, y un número arábigo, que indica el orden del descubrimiento (Ruiz, 2003).

Debido a que los grupos funcionales que reconocen estas enzimas son dos; amino e hidroxilo, una misma enzima puede afectar a más de un aminoglucósido, y de la misma manera, un aminoglucósido puede ser modificado por más de una enzima, provocando resistencia cruzada, y el mapeo de los patrones de resistencia de las EMAG, en los diferentes grupos bacterianos (Courvalin *et al.*, 2006).

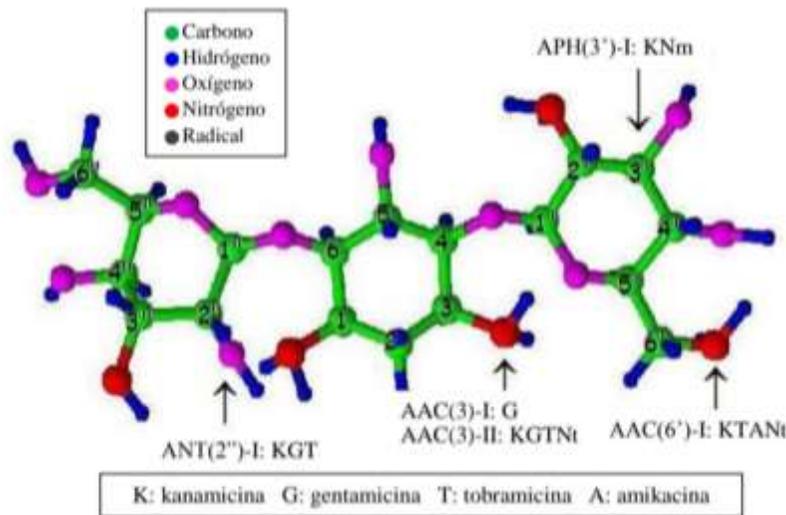


Fig. 4. Sitio de unión de las EMAG (Courvalin *et al.*, 2006).

Con los avances en el desarrollo de las técnicas moleculares para la investigación, principalmente la invención de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha facilitado la detección, seguimiento y localización de elementos móviles en el genoma bacteriano

para la investigación de la resistencia bacteriana a los antibióticos y otros factores de virulencia (Somma *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, cerca del 55% de la población adulta entre los 19 y 44 años padece de alguna enfermedad periodontal, además, se estima que el 33% de estas infecciones tienen un origen exógeno y son inducidas por bacilos Gramnegativos, como *E. coli*.

El tratamiento de las enfermedades periodontales se ha complicado por la alta resistencia de *E. coli* a los antibióticos utilizados tradicionalmente, debido a la adquisición de genes que codifican para algún mecanismo de resistencia a los éstos.

ANTECEDENTES

Slot y colaboradores en 1990, examinaron la frecuencia de aparición de bacterias Gramnegativas y anaerobias facultativas no orales en 3050 adultos con periodontitis avanzada, encontrando que el 14% (n=427) de ellos presentó alguna bacteria perteneciente a las familias de Pseudomonaceae, Enterobacteriaceae y Acinetobacter. Además, encontró que estas cepas fueron multi-resistentes a 18 de los 30 antibióticos probados.

Por su parte, Souto y colaboradores (2006) en un estudio realizado en Brasil, identificaron por métodos moleculares a *E. coli* en la placa bacteriana subgingival de 100 pacientes enfermos con periodontitis crónica, de los cuales 14 son portadoras de *E. coli* y otros 61 pacientes son portadores de bacilos entéricos Gramnegativos. En general, encontraron que *E. coli* junto a otras enterobacterias, fueron más frecuentes en las pacientes con periodontitis crónica, que las bacterias ya descritas de la microbiota normal de la placa subgingival, lo que incrementa la frecuencia de enfermos por alguna enfermedad periodontal en Brasil.

Posteriormente en Brasil, Souto y Colombo (2008) reportaron la presencia de enterobacterias asociadas a periodontitis crónica en 225 pacientes, de los cuales 56 resultaron tener una sobreinfección por bacterias comensales de la placa subgingival y de la saliva, y el 40% (n=90) resultó ser portador de algún bacilo entérico Gramnegativo y el 47% (n=106) fue portador de *Enterococcus faecalis*.

En un estudio en Suecia, se encontró que en cepas comensales de *E. coli* (n=128) resistentes a ampicilina, muestran una baja presencia de la betalactamasa *blaSHV* (n=5) (Karami *et al.*, 2008).

Por otra parte, Karami y colaboradores (2006), en un estudio en cepas de *E. coli* comensales realizado en infantes de Suecia, demostró que *tetB* y *tetA* fueron genes frecuentes (50 y 49% respectivamente) de las 37 cepas estudiadas (n=37), lo cual es importante debido a que las tetraciclinas no se usan en niños, y estas bacterias ya poseían estos genes como mecanismos moleculares de resistencia a este antibiótico.

Bailey y colaboradores en 2010 reportan en un estudio realizado en Australia que las cepas de *E. coli* aisladas de materia fecal en adultos fueron portadoras de los genes de resistencia a sulfonamidas (*su1*, *su2* y *su3*) y trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA7* y *dfrA17*), además que estos genes están relacionados con integrones de tipo 1 y 2.

OBJETIVO GENERAL

1. Determinar la distribución del genotipo de resistencia a los antibióticos en un grupo de 100 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia de *E. coli* periodontal.
2. Establecer la frecuencia de los genes de resistencia a tetraciclina (*tet(A)* y *tet(B)*), aminoglucósidos (*aac(3)-IV*, *aadA1*), trimetoprim (*dfrA1*), estreptomicina (*aadA1*), sulfonamidas (*sul-1*), cloranfenicol (*cmIA* y *cat1*) y betalactámicos (*blaSHV* y *CITM*) en las cepas de *E. coli*.
3. Identificar los patrones de asociación de los genes que codifican para la resistencia a los diferentes grupos de antibióticos en las cepas periodontales de *Escherichia coli*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Para el desarrollo del estudio se analizaron 100 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes que acudieron a la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala, municipio de Tlalnepantla, Estado de México, por presentar signos y síntomas de alguna enfermedad periodontal.

Siembra de las muestras

Las cepas bacterianas almacenadas en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala, FESI, fueron resembradas por el método de estría cruzada en el medio de cultivo de Agar EMB (Eosina-Azul de Metileno) y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Extracción del DNA de *E. coli* periodontal

Para extraer el DNA, se tomaron por medio de un asa bacteriológica varias colonias del crecimiento bacteriano y se suspendieron en un tubo de ensayo de 16x150 mm estéril que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. Posteriormente, se homogeneizaron las muestras mediante agitación por vórtex durante 20 segundos y se introdujeron en un vaso de precipitados de 500 mL para someterlos a baño María (100°C) durante 20 minutos. Al término se colocaron en un recipiente con hielo (0°C) por 10 minutos.

Utilizando la micropipeta con puntas estériles, se tomó 1 mL de muestra y se depositó en un tubo eppendorf nuevo estéril. Las muestras se centrifugaron a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos. Acto seguido, se depositó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril, el cual contenía el DNA de *E. coli* periodontal, se etiquetó y guardó en el congelador a -20°C para su posterior tratamiento.

Identificación de *E. coli* por PCR convencional

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas mediante la amplificación del gen 16S RNA, para lo cual se utilizó la mezcla de reacción Taq DNA Polymerase 2x Master Mix marca AMPLIQON, que contenía 1.5 mmol de MgCl₂, 0.2 unidades por µL de ampliçon Taq DNA

Polymerase, y 0.4 mmol de dNTPs. Para un volumen final de 15 μ L por cada muestra de reacción se utilizó: 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) a una concentración de 10 pmol (Tabla 1), 4 μ L de agua desionizada estéril libre de nucleasas, 3 μ L de DNA de *E. coli* y 6 μ L de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix ampliqon. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos. Finalmente, la extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. La cepa de *E. coli* ATCC 25772 fue utilizada como control positivo.

La identificación de los genes que codifican para la resistencia a antibióticos a estreptomicina (*aadA1*), gentamicina (*aac(3)-IV*), sulfonamidas (*sul1*), aminoglucósidos (*blaSHV* y *CITM*), cloranfenicol (*cat1* y *cmlA*), tetraciclinas A y B (*tet(A)*, *tet(B)*), trimetoprim (*dfrA1*) y quinolonas (*qnr*) se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional. Los oligonucleótidos utilizados para la identificación de los genes en las cepas de *E. coli* se describen en la Tabla 1.

Las condiciones de amplificación de PCR convencional y los oligonucleótidos correspondientes para identificar los genes de resistencia a la estreptomicina (*aadA1*), gentamicina (*aac(3)-IV*), sulfonamida (*sul1*), betalactámicos (*blaSHV* y *CITM*) y cloranfenicol (*cmlA* y *cat1*) fueron descritos por Van y colaboradores en 2008. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 15 μ L: 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) a una concentración de 10 pmol, 4 μ L de agua desionizada estéril libre de nucleasas, 3 μ L de DNA de *E. coli* I y 6 μ L de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix ampliqon. Las condiciones de amplificación para estos genes fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos. Finalmente, la extensión se prolongó por 7 minutos a 72°C.

En cuanto a la identificación de los genes de resistencia a tetraciclina A (*tetA*) y tetraciclina B (*tetB*) se utilizaron las condiciones y oligonucleótidos descritos por Randall *et al* (2004). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 15 μ L: 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) a una concentración de 10 pmol, 4 μ L de agua desionizada estéril libre de nucleasas, 3 μ L de DNA de *E. coli* y 6 μ L de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix ampliqon. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a

95°C por 30 segundos, alineación a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

Los oligonucleótidos y condiciones de PCR para identificar al gen de resistencia a trimetoprim (*dfrA1*) fueron descritos por Toro y colaboradores en 2005, se utilizaron 4 µL de agua desionizada estéril libre de nucleasas, 3 µL de DNA de *E. coli*, 6 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix ampliqon y 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) a una concentración de 5 pmol, para un volumen final de 15 µL en la mezcla de reacción. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 92°C por 30 segundos, alineación a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos. Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C.

El gen de resistencia a las quinolonas (*qnr*) se identificó mediante las condiciones descritas por Mammeri *et al* (2005). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 15 µL: 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse) a una concentración de 5 pmol, 4 µL de agua desionizada estéril libre de nucleasas. 3 µL de DNA de *E. coli* periodontal y 6 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix ampliqon. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 92°C por 30 segundos, alineación a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de resistencia a los antibióticos en cepas periodontales de E. coli

Antibiótico	Gen	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
	<i>16SRNA</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	919	Momtaz et al., 2013
Estreptomicina	<i>aadA1</i>	TATCCAGCTAAGCGGAACT ATTTGCCGACTACCTTGGTC	447	Van et al., 2008
Gentamicina	<i>aac(3)-IV</i>	CTTCAGGATGGCAAGTTGGTT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	286	Van et al., 2008
Sulfonamida	<i>sul1</i>	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCTCGGTCTC	82	Van et al., 2008
Betalactámico	<i>blaSHV</i>	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	768	Van et al., 2008
Betalactámico	<i>CITM</i>	TGGCCAGAAGTACAGGCAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	Van et al., 2008
Cloranfenicol	<i>cmlA</i>	AGTTGCTCCAATGTACCTATAACC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547	Van et al., 2008
Cloranfenicol	<i>cat1</i>	CCGCCACGGTGTGTTGTTATC CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	598	Van et al., 2008
Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	GGTTCACCTCGAACGACGTCA CTGTCCGACAAGTTGCATGA	577	Randall et al., 2004
Tetraciclina	<i>tet(B)</i>	GGTTCACCTCGAACGACGTCA CTGTCCGACAAGTTGCATGA	634	Randall et al., 2004
Trimetoprim	<i>dfra1</i>	GGAGTGCCAAAGGTGAACAGCGGA GGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC	367	Toro et al., 2005
Quinolonas	<i>qnr</i>	GGGTATGGATATTATTGATAAAG CTAATCCGGCAGCACTATTTA	670	Mammeri et al., 2005

Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de Agarosa

Los amplicones obtenidos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa en una concentración del 2% con la adición de 0.3 μ L de Midori Green (BIORAD) para su visualización. Las condiciones de corrimiento fueron: 120 volts, 94 miliamperes, por un lapso de entre 35 y 40 minutos. Los tamaños de los fragmentos analizados fueron comparados con un marcador molecular de 100 pb de tamaño. Los genes fueron analizados bajo luz ultravioleta y fotografiados con el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100 KODAK).

RESULTADOS

Pacientes analizados

Para el desarrollo de este estudio se analizaron las cepas (n=100) previamente aisladas de pacientes con enfermedad periodontal, que acudieron a la clínica de endoperiodontología de la FES Iztacala. De los pacientes analizados, el 56% correspondió al sexo masculino (n=56) y el 44% (n=44) al sexo femenino (Fig. 5).

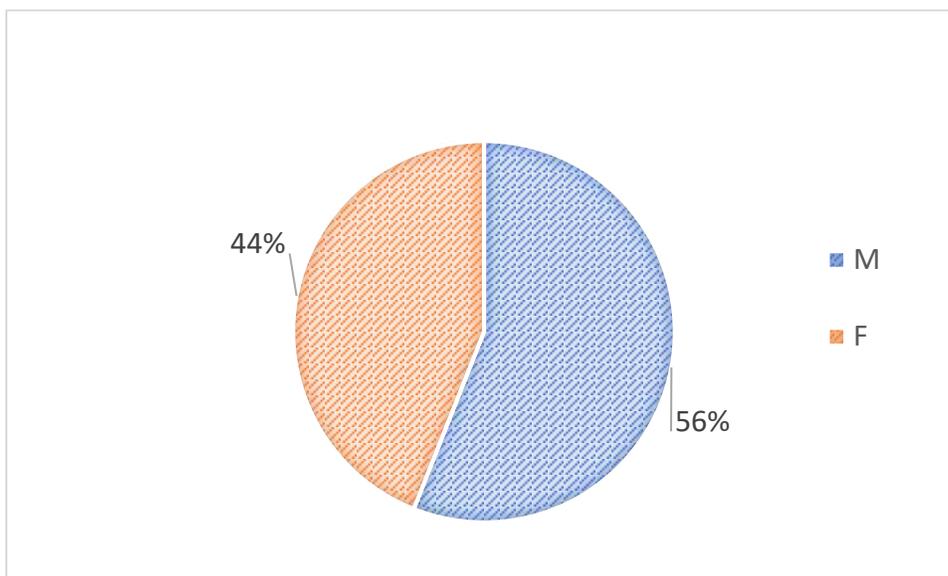


Figura 5. Sexo de los pacientes con enfermedad periodontal.

F: femenino. M: masculino, (n=100).

La edad de los pacientes se distribuyó en el rango de 15 hasta 85 años. La mayor frecuencia de los pacientes con enfermedad periodontal asociada por *E. coli* se encontró en el rango de edad de 61-70 años, seguido de 51-60 (Fig. 6).

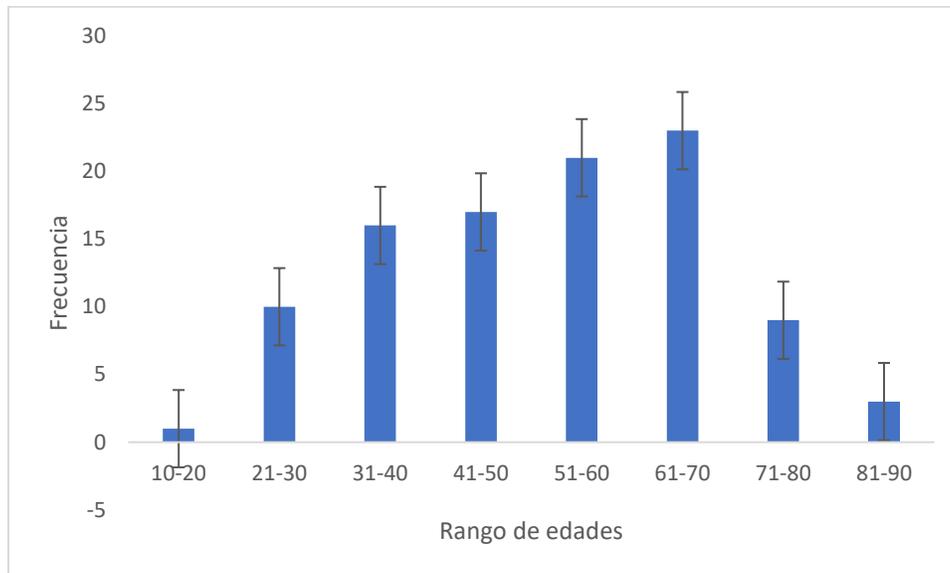


Figura 6. Frecuencia de edad de los pacientes con *E. coli* periodontal. Edad mínima: 15 años. Edad máxima: 86 años. Moda: 65 años. Media: 52 años

El diagnóstico clínico más frecuente en los pacientes estudiados fue la Periodontitis Moderada Generalizada (PMG, n=28), seguido de Periodontitis Aguda Generalizada (PAG, n=25) (Fig 7).

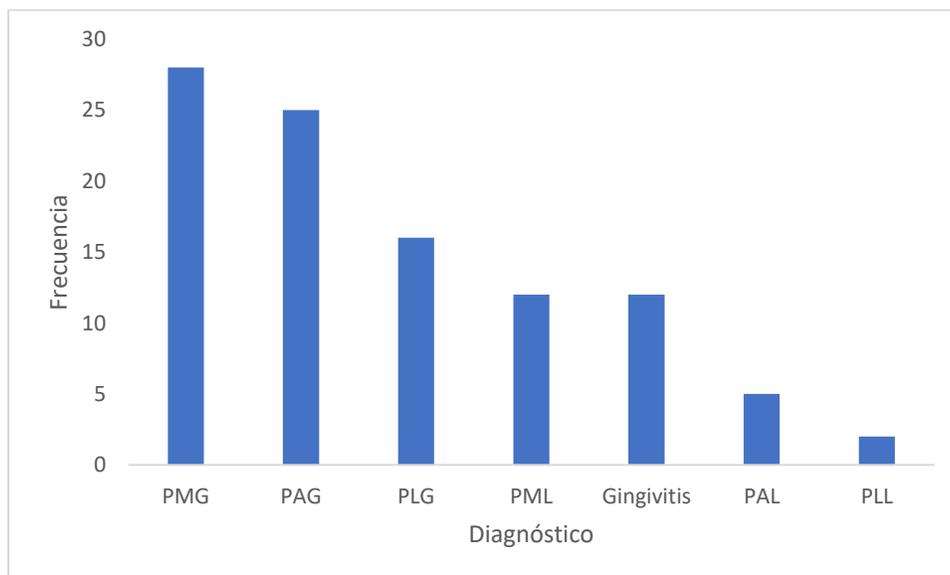


Figura 7. Frecuencia de los Diagnósticos Clínicos de las pacientes con Enfermedad Periodontal asociada a *E. coli*. PMG (Periodontitis Moderada Generalizada). PAG

(Periodontitis Aguda Generalizada). PLG (Periodontitis Leve Generalizada). PML (Periodontitis Moderada Localizada). Gingivitis. PAL (Periodontitis Aguda Localizada). PLL (Periodontitis Leve Localizada).

Identificación de las cepas de *E. coli* periodontal

La identificación de las cepas de *E. coli* se realizó mediante la amplificación del gen ribosomal 16sRNA, la cual se realizó mediante PCR de punto final y electroforesis. Como control positivo se utilizó una cepa de *E. coli* ATCC 25772 (Fig. 8)

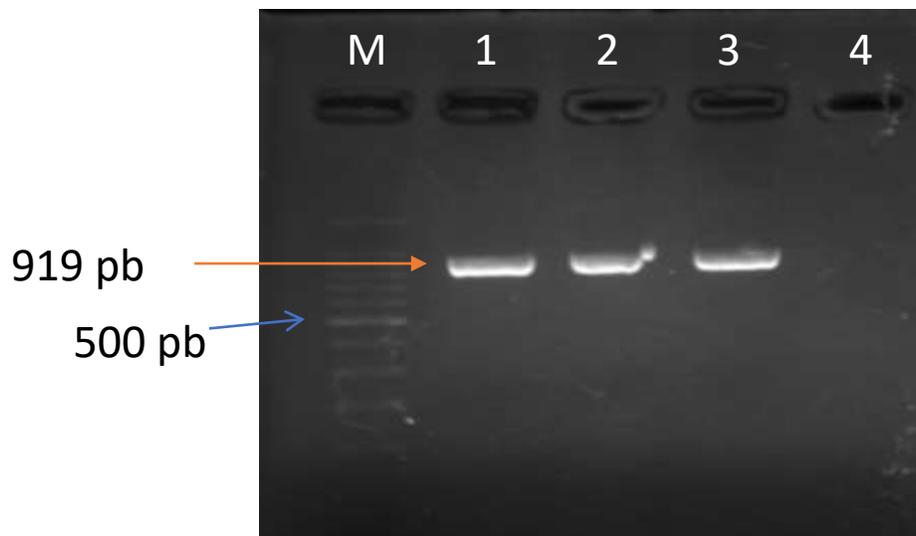


Figura 8. Detección del gen ribosomal 16SRNA en cepas de *E. coli* periodontal. M: marcador molecular de 100pb. Línea 1: control positivo de la cepa ATCC 25772. Línea 2 y 3 cepas positivas. Línea 4: control negativo (sin DNA molde) (amplión de 919 pb).

Frecuencia de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *E. coli*

La detección de los genes de resistencia a los antibióticos se realizó por PCR en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal (Cuadro 2).

La frecuencia más alta la presentaron los genes que codifican para la resistencia a tetraciclina (*tet(A)*) (Cuadro 2, Figura 9) y trimetoprim (*dfrA1*), (Cuadro 2, Figura 10). El gen de resistencia a la gentamicina (*aac(3)-IV*) se encontró en el 30% de las cepas de *E. coli* periodontal (Figura 11). Los genes *aadA1* (estreptomicina) y *sul1* (sulfonamidas) se detectaron en el 28% de las cepas estudiadas, en cada caso (cuadro 2, Figuras. 12 y 13, respectivamente). Por su parte, el gen *qnr* (Quinolone Resistant), que codifica mecanismos

moleculares para la resistencia a las quinolonas se detectó en el 18% de las cepas analizadas de pacientes con enfermedad periodontal (Figura 14).

Por último, el gen que codifican para la resistencia a los betalactámicos (*CITM*) se detectó en el 14% (n=14), mientras que el gen *blaSHV* no fue encontrado en ninguna de las cepas (cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de los genes de resistencia a los antibióticos.

Antibiótico	Gen	Número de cepas portadoras del gen N=100	Porcentaje %
Estreptomicina	<i>aadA1</i>	28	28
Gentamicina	<i>aac(3)-IV</i>	30	30
Sulfonamida	<i>sul-1</i>	28	28
Betalactámico	<i>blaSHV</i>	0	0
Betalactámico	<i>CITM</i>	14	14
Cloranfenicol	<i>cat1</i>	20	20
Cloranfenicol	<i>cmlA</i>	1	1
Tetraciclina	<i>tet(A)</i>	47	47
Tetraciclina	<i>tet(B)</i>	26	26
Trimetoprim	<i>dfrA1</i>	32	32
Quinolona	<i>qnr</i>	18	18

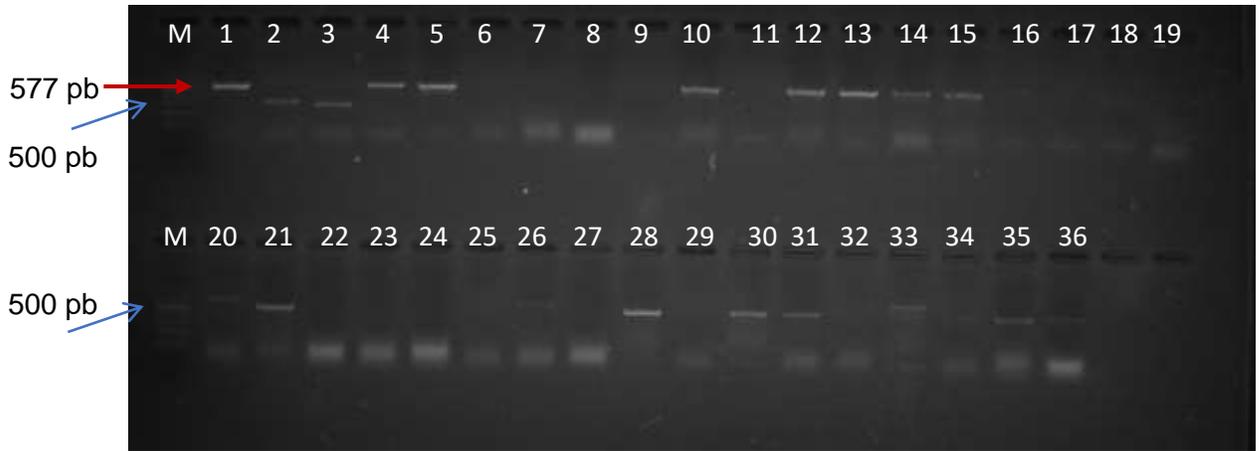


Figura 9. Identificación del gen de resistencia a tetraciclina *tet(A)* en cepas de *E. coli*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 1 control positivo (cepa de *E. coli* portadora del gen). Líneas 4, 5, 10, 12-15, 21, 26, 28, 30-31 y 34-36 cepas positivas (amplificación de 577 pb). Línea 17, control negativo (sin DNA molde).

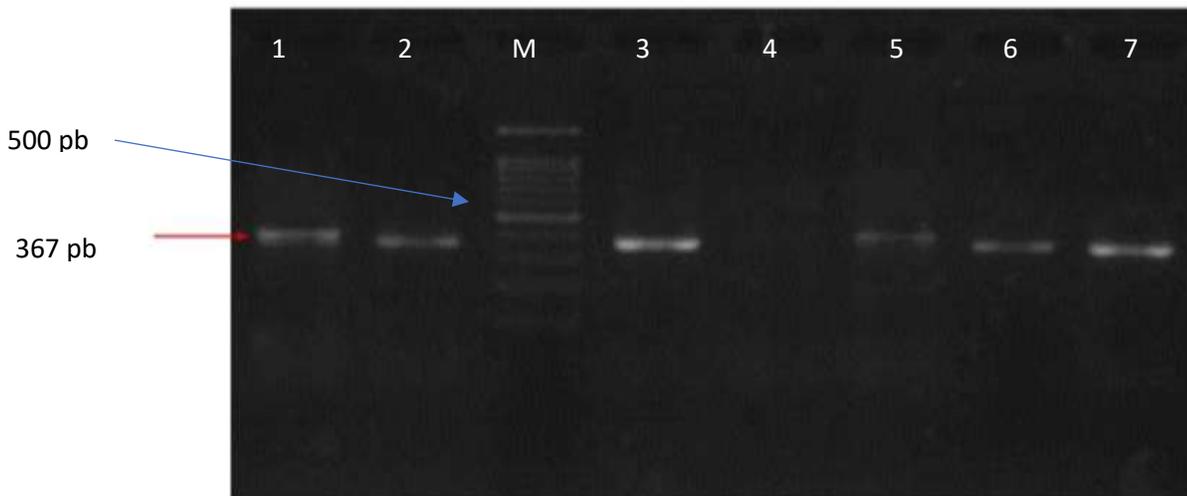


Figura 10. Identificación del gen de resistencia a trimetoprim (*dfrA1*) en cepas de *E. coli* periodontal. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 1, control positivo (cepa de *E. coli* portadora del gen). Líneas, 2-3, 5-7 cepas positivas (amplificación de 367 pb). Línea 4, control negativo (sin DNA molde).

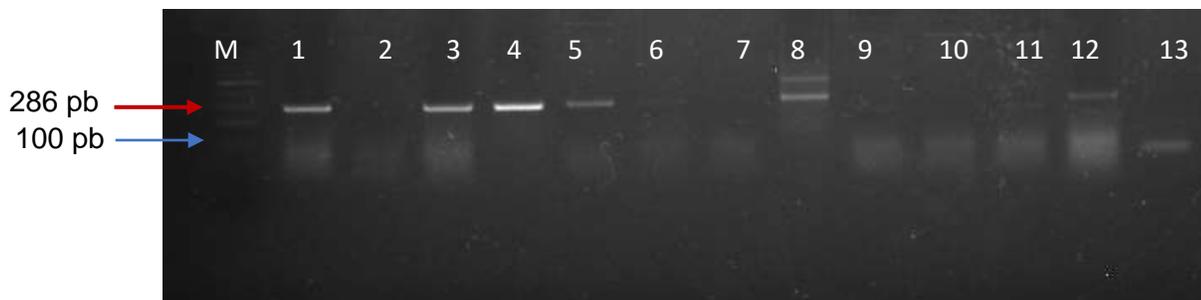


Figura. 11. Identificación del gen de resistencia a gentamicina (*aac(3)-IV*) en cepas de *E. coli*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 1, control (cepa de *E. coli* portadora del gen). Líneas 3-5. 8 y 12 positivas (amplicón de 286 pb). Línea 2, control negativo (sin DNA molde)

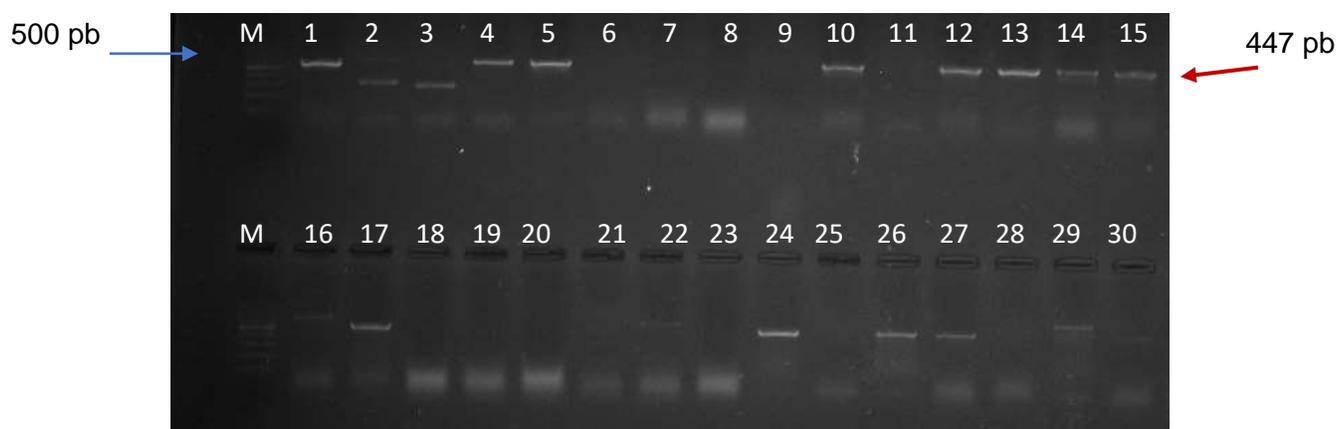


Figura 12. Identificación del gen de resistencia a estreptomycin (*aadA1*) en cepas de *E. coli* periodontal. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 1, control positivo (cepa portadora del gen). Líneas 4, 5, 10, 12-15, 17, 24, 26-27, y 29 cepas positivas (amplicón de 447 pb). Línea 9, control negativo (sin DNA molde).

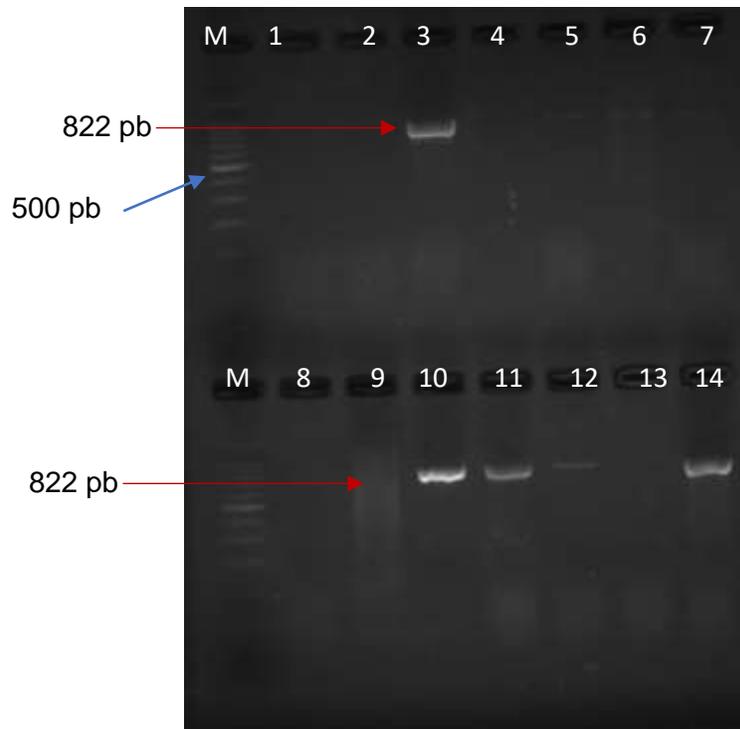


Figura 13. Identificación del gen de resistencia a sulfonamidas en cepas de *E. coli*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 3, control positivo (cepa de *E. coli* portadora del gen). Líneas 10, 11, y 14 cepas positivas (amplicón de 822 pb). Línea 1, control negativo (sin DNA molde).

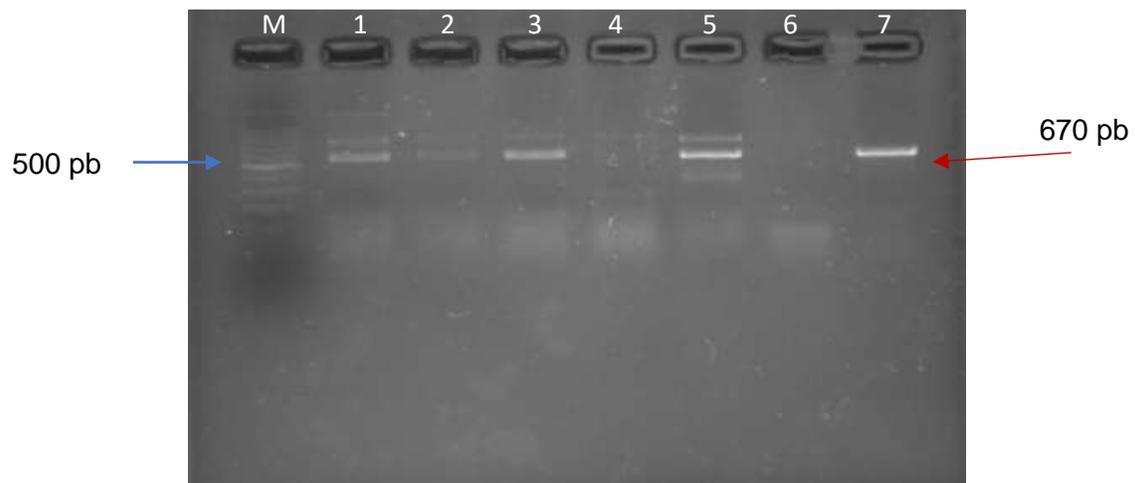


Figura. 14. Identificación del gen de resistencia a quinolonas (*qnr*) en cepas de *E. coli*. M, marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 1, control positivo (cepa portadora del gen). Líneas 2-3, 5 y 7 cepas positivas (amplicón de 670 pb). Línea 6, control negativo (sin DNA molde)

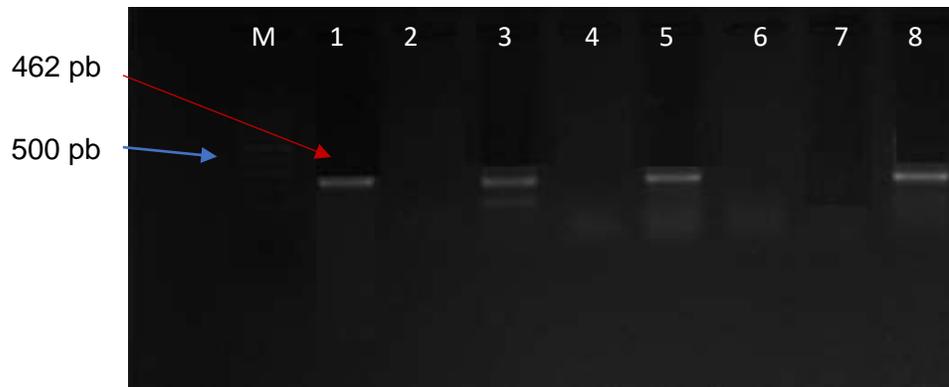


Figura 15. Identificación del gen de resistencia a betalactámicos (*CITM*) en cepas de *E. coli* periodontal. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 1, control positivo (cepa de *E. coli* portadora del gen). Líneas 3, 5 y 8 cepas positivas (amplicón de 462 pb). Línea 6, control negativo, (sin DNA molde).

Patrones de asociación de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *E. coli* periodontal

Se identificaron 11 patrones de resistencia a los antibióticos en las cien cepas de *E. coli* periodontal analizadas, la frecuencia más alta es la de la asociación de los genes de resistencia a tetraciclina-gentamicina(*tetA*)-*aac(3)-IV*), estreptomicina-gentamicina-tetraciclina ((*aadA1*)-*aac(3)-IV*)-(tetA) y tetraciclina A-tetraciclina B (*tet(A)-tet(B)*) con 16, 15 y 13 cepas respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Patrones de asociación de genes de resistencia a los antibióticos de *E. coli*

Número de patrón	Genes de resistencia	No. de cepas N=100
1	Ninguno	5
2	<i>tetA, aac(3)-IV</i>	16
3	<i>aadA1, aac(3)-IV, tetA</i>	15
4	<i>tetA, tetB</i>	13
5	<i>aac(3)-IV, dfrA1</i>	11
6	<i>tetA, qnr</i>	10
7	<i>cat-1, tetA</i>	8
8	<i>aac(3)-IV, sul-1</i>	7
9	<i>tetA, cat-1</i>	6
10	<i>sul-1. CITM</i>	5
11	<i>aadA1, sul-1</i>	4

DISCUSIÓN

Pacientes analizados

En este estudio se analizaron las cepas bacterianas de *E.coli* de 100 pacientes con enfermedad periodontal que acudieron a la clínica de Endoperiodontología de la CUSI, FES Iztacala, donde el 56% correspondió al sexo masculino y el 44% al sexo femenino (Figura 5). Estos porcentajes son parecidos a los descritos por Botero y colaboradores (2008), quienes aislaron bacilos Gramnegativos, en su mayoría *E. coli* de pacientes con enfermedad periodontal, siendo el 69% hombres. La enfermedad periodontal es un padecimiento mundial que afecta a más del 50% de la población (Alvear *et al.*, 2010), principalmente a los adultos, debido a alteraciones en factores sistémicos (sistema endócrino, discrasias sanguíneas), mala nutrición (déficit de ácido ascórbico), virus, hongos, traumatismos (físicos o químicos), factores genéticos como la fibromatosis gingival hereditaria y por alteraciones en el microbioma oral. Dentro de la enfermedad periodontal, se reconocen a las infecciones bacterianas de naturaleza endógena, causadas por bacterias comensales en la placa supra y subgingival. No obstante, las infecciones exógenas, o verdaderas infecciones periodontales son causadas por bacterias no habituales en la placa, al igual que las sobre infecciones periodontales, que son causadas por enterobacterias (Farías, 2012).

La edad más frecuente de los pacientes en este estudio se distribuyó en el rango de 40 a 70 años (Figura 6), la cual coincide con lo descrito por Pimentel *et al.*, (2006), quienes reportaron en un estudio realizado a 96 pacientes (n=96) con enfermedad periodontal causada por *E. coli* que el rango de edad predominante fue entre los 40 y 60 años, mientras que en el año 2002, Napoles *et al.*, (2002) reportaron que la edad más frecuente en la que se presenta la enfermedad periodontal es en la tercera edad (más de 65 años), lo cual coincide con este estudio, donde la edad predominante fue en el rango de 65-70 años (Figura 6).

El diagnóstico con la frecuencia más alta en los pacientes estudiados fue para Periodontitis Moderada Generalizada (PMG, Figura 7), seguido de Periodontitis Aguda Generalizada (PAG). Estos porcentajes coinciden con lo descrito por Escudero y colaboradores (2008), quienes aseveran que la periodontitis generalizada es la forma más frecuente de la periodontitis, además que la severidad de la enfermedad se incrementa conforme la edad avanza en los pacientes. Por su parte, Albandar (2005) reporta que la periodontitis

generalizada tiene una frecuencia del 30%, y la gravedad de la enfermedad se incrementa exponencialmente con la edad, hasta la posible pérdida de las piezas dentales.

Identificación de las cepas y enfermedad periodontal

En este estudio se analizaron 100 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal. Las cepas fueron identificadas molecularmente mediante la amplificación por PCR del gen ribosomal 16sRNA (Figura 8). Este método ha sido descrito por Magray y colaboradores en 2011 para identificar cepas clínicas de *Escherichia coli*.

Se ha descrito que la frecuencia de *E. coli* asociada a enfermedades periodontales varía principalmente con las condiciones socioculturales de la población, así mismo, influyen otros factores como la genética, alteraciones sistémicas, traumatismos físicos y químicos y la alteración de la placa subgingival por bacterias exógenas (Farias, 2012).

La prevalencia de *E. coli* en la enfermedad periodontal ha ido a la alza en los últimos años, Herrera y colaboradores (2008) describieron el perfil microbiológico de 100 pacientes con enfermedad periodontal en Colombia, Chile y España, en donde encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de los bacilos entéricos Gramnegativos, entre ellos *E. coli*, siendo Colombia y Chile los países con mayor prevalencia con el 36 y 17% respectivamente, mientras que en España no se detectó *E. coli*, por lo que el tratamiento fue más efectivo y sólo se implementaron antibióticos, mientras que en los países latinoamericanos se hicieron tratamientos mecánicos (raspados) y se usaron antibióticos, debido a que *E. coli* posee factores de virulencia que le facilitan la invasión y destrucción de tejido tisular, así mismo, predisponen la acumulación de grasa dentro de las arterias, aumentan el colesterol y los triglicéridos. Adicionalmente, tiene la capacidad de liberar endotoxinas y moléculas de adhesión, que alteran la respuesta inmune del hospedero, como la circulación de granulocitos e inactivación del sistema de complemento (Ardila *et al*, 2010).

En México se estudió la prevalencia de las enfermedades periodontales en 100 pacientes inmunodeprimidos en México, encontraron que 59.7% de los pacientes padecía alguna enfermedad periodontal y la mayoría fue portador de *E. coli*, además de poseer *Klebsiella pneumoniae* y *Enterbacter cloacae* y el hongo *Candida albicans* (Pereyra *et al.*, 2006)

En Chile, Ardila (2010) realizó una investigación en donde participaron 75 pacientes con edades de entre 13 y 52 años. Todos los pacientes padecían periodontitis crónica o

agresiva. En los perfiles microbiológicos se identificó a *E. coli* en el 17.6% de los pacientes con enfermedad periodontal, seguido de *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes faecalis*.

Shaddox y colaboradores (2013) estudiaron la relación del lipopolisacárido (LPS) y la inflamación en la periodontitis localizada agresiva (LPA) en cepas de *E. coli*, encontrando que la pérdida de piezas dentales se debe a la respuesta inmune del hospedero con el LPS, además de la invasión y destrucción del tejido de soporte del diente, e incluso, el proceso inflamatorio continua hasta un año después del tratamiento.

Genes de resistencia a los antibióticos

Tetraciclina

En este estudio se encontró que los genes de resistencia a tetraciclina *tet(A)* y *tet(B)* se identificaron en el 47 y 26% de las 100 cepas, respectivamente (cuadro 2). Trallero y colaboradores (2010) reportaron que las cepas de *E. coli*, poseen resistencia adquirida frente a los fármacos de la familia de las tetraciclinas, además han detectado cepas de *E. coli* multirresistentes durante los tratamientos con tetraciclinas de tercera generación como la tigeciclina. Mosquito y colaboradores (2011) describieron que la alta resistencia a tetraciclina se debe a la transferencia horizontal de genes que codifican diferentes mecanismos moleculares de resistencia, como las bombas de eflujo de antibióticos codificados por el gen *tet(A)*. Se ha descrito que los genes más frecuentes en cepas de *E. coli* comensales de niños en Suecia, son *tet(A)* y *tet(B)* con una frecuencia del 50 y 49%, respectivamente, se detectaron en el 100 % de un total de 37 cepas aisladas (Karami y colaboradores (2006), lo cual es importante debido a que las tetraciclinas no se usan en niños, y las bacterias ya poseen estos genes como mecanismos moleculares de resistencia a este antibiótico.

Además, en otro estudio Mosquito *et al* (2011) reportaron que en cepas de *E. coli* aisladas en Perú, *tet(A)* y *tet(B)* son los genes más frecuentes que codifican para resistencia a las tetraciclinas, coincidiendo con los datos encontrados este trabajo.

Por otro lado, se ha demostrado que las bombas de eflujo tipo RND, codificadas por el gen *tet(B)* confieren resistencia a la tetraciclina y a las minociclinas, por un fenómeno llamada resistencia cruzada (Opazo *et al.*, 2009).

Cloranfenicol

En este estudio de 100 cepas analizadas, se encontró que el 20% de las cepas de *E. coli* fue portadora del gen *cat1*, mientras que *cmlA* solo se identificó en 1 cepa (Cuadro 2).

Si bien el cloranfenicol no es un antibiótico utilizado con frecuencia en nuestro país para tratar las infecciones por Gramnegativos debido a sus efectos colaterales, el hecho de encontrarlo en las cepas probablemente se deba a que en ocasiones se utiliza por los odontólogos para combatir infecciones por anaerobios, en cuyo caso se han seleccionado las cepas de *E. coli* como resistentes a este agente. La baja frecuencia del gen *cmlA* encontrada en este estudio coincide con lo descrito por Momtaz y colaboradores (2013) en un estudio de detección de genes de resistencia a los antibióticos en *E. coli* uropatógena.

Betalactámicos

De las 100 cepas analizadas se encontró que el 14 % de las *E. coli* fue portadora del gen *CITM* (Citrato Transporter of Mg²⁺) mientras que *blaSHV* (Beta lactamase Sulphydryl Heagent Variable) no se identificó en ninguna de las cepas (Cuadro 2), La baja frecuencia del gen *blaSHV* en las cepas de *E. coli*, coincide con la reportada por Vignoli y colaboradores en 2005; donde describieron que la frecuencia del gen *blaSHV* es relativamente baja, pues se presentó en 5 de cada 32 cepas en un estudio realizado en Suecia, siendo el gen *blaOXA-1* el más frecuente en cepas de *E. coli* comensales de origen intestinal en niños.

Además, en un estudio en Suecia, se encontró que en cepas comensales de *E. coli* (n=128) resistentes a ampicilina, muestran una baja presencia del gen de betalactamasas *blaSHV* (n=5) (Karami *et al.*, 2008).

En un trabajo realizado por Silva *et al.*, (2000) reportaron que para las betalactamasas de la familia A, dentro de la subfamilia de *blaSHV* y sus 114 mutantes descritas, está ampliamente distribuida en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* intrahospitalarias y no en *E. coli*, lo que pudiera explicar la nula frecuencia del gen en las cepas periodontales de *E. coli*.

Trimetoprim

En este estudio se encontró que el 32 % de las 100 cepas de *E. coli* fue portadora del gen *dfrA1* (Cuadro 2, Figura 10). El trimetoprim en nuestro país es un antibiótico utilizado con

frecuencia para tratar las infecciones por bacterias Gramnegativas, ocasionando con el tiempo la selección de cepas resistentes a este antimicrobiano. Los porcentajes de resistencia para Trimetoprim encontrado en este estudio son semejantes a los descritos por Moredo y colaboradores (2007), en Argentina. Estos autores han descrito que *dfrA1* es uno de los genes más frecuentes de resistencia a los antibióticos, con un porcentaje del 35% (n=70) en cepas aisladas de *E. coli* de los 200 pacientes analizados.

Streptomycin

El gen *aadA1* (28%) fue uno de los genes identificados con mayor frecuencia entre las 100 cepas de *E. coli* (Cuadro 2, Figura 12). Datos similares fueron reportados en Argentina por Moredo *et al* (2007), en donde reportaron que el gen *aadA1* es uno de los genes más comunes entre las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades periodontales con un 70% de los 150 pacientes estudiados.

Gentamicin

El gen *aac(3)-IV* (Aminoglycoside N (3)- acetyltransferase) que codifica para la resistencia a la gentamicina fue identificado en el 30% de las 100 cepas de *E. coli* (Cuadro 2). La gentamicina como otros antibióticos de la familia de los aminoglucósidos son utilizados en México para tratar infecciones muy agudas por bacterias, principalmente Gramnegativas, lo que pudiera ser un factor importante de selección de cepas resistentes a este agente. El porcentaje de resistencia encontrado en este estudio es superior al descrito por Boue *et al.*, (2019), quien describió una frecuencia del 16.1% de los 567 pacientes analizados, en donde evaluó la resistencia a los antimicrobianos en cepas de *E. coli*.

Sulfonamide

En este estudio de 100 cepas se encontró que el 28% de las *E. coli* fue portadora del gen *sul-1* (Cuadro 2). En México la sulfonamida (sulfametoxazol) es un antibiótico que se utiliza frecuentemente en combinación con el trimetoprim, y es conocido como el Bactrim, para tratar diferentes infecciones bacterianas, lo que ha ocasionado con el tiempo la selección de bacterias resistentes a estos antimicrobianos. Por ejemplo, Bailey y colaboradores en 2010 describieron en un estudio donde analizaron 200 pacientes, realizado en Australia, que las cepas de *E. coli* aisladas de materia fecal en adultos fueron portadoras de los genes

de resistencia a sulfonamidas (*su1*, *su2* y *su3*) y trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA7* y *dfrA17*), además que estos genes se encontraron relacionados con los integrones de clase 1 y 2.

Quinolonas

En este estudio se encontró que el 18 % de las cepas de *E. coli* fue portadora del gen *qnr* (Quinolone Resistant) (Cuadro 2, Figura 10). Recientemente el uso de las quinolonas para tratar las infecciones en nuestro país se ha incrementado paulatinamente, ocasionando la selección de cepas resistentes. Contreras y colaboradores (2014) han descrito el uso de la moxifloxacina, perteneciente a la familia de las quinolonas, como una nueva alternativa para el tratamiento de los patógenos de la placa subgingival, presente en los pacientes con enfermedad periodontal. Sin embargo, el uso indiscriminado de los antibióticos representa un problema a nivel mundial, ya que las especies bacterianas se han seleccionado como resistentes a estos tratamientos con el paso del tiempo, en especial los bacilos Gramnegativos como *E. coli*, que posee una alta prevalencia en las enfermedades periodontales a nivel mundial, principalmente en Latinoamérica, siendo Colombia (36%) y Chile (17%), los países con una mayor frecuencia de casos con bacilos entéricos en la placa subgingival. Se ha reportado que la frecuencia bacteriana depende de la geografía, cultura y otros factores como la etnias, niveles socioeconómicos, etc (Sanz *et al.*, 2000). Dichos bacilos entéricos Gramnegativos son resistentes a un gran número de antibióticos, que sumado a los diversos genes que le confieren virulencia, que va desde la formación de capsulas, adhesinas, la liberación de endotoxinas, ocasionan procesos infecciosos crónicos. Es frecuente que los genes de resistencia a los antibióticos sean adquiridos por las enterobacterias a través de la transferencia horizontal de plásmidos, transposones e integrones.

Elementos genéticos móviles: plásmidos, transposones e integrones

En este estudio se encontró una elevada frecuencia de los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli* (cuadro 2). Los genes de resistencia a diferentes antibióticos se relacionan directamente con elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones. Estos, como elementos de expresión genética, incorporan genes sin promotor, de tal modo que se convierten en genes funcionales, en consecuencia,

el integrón actúa como un cassette de expresión para los genes que se inserten y por lo general más de un gen se integra. Los integrones clase 1 son los más estudiados por su importancia médica en el desarrollo de las infecciones y aislamientos clínicos. La movilización de estos cassettes se logra por la acción de la integrasa, la cual a través de mutaciones y la recombinación genética, genera distintas configuraciones y combinación de cassettes, lo que provoca la selección de las bacterias como resistentes o multirresistentes a los antimicrobianos (Garza-Ramos *et al.*, 2009).

Narváez y colaboradores (2005), describieron plásmidos de *E. coli* y sus patrones de resistencia a los antibióticos, reportando que estos le conferían a la bacteria multirresistencia a aminoglucósidos, tales como amikacina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, amoxicilina, ácido clavulánico, entre otros. En un estudio realizado por Aguado y Eisenstein (1998;1994) describen un grupo de plásmidos tipo R, que le confiere resistencia a los antibióticos a las cepas de *E. coli* cuando este se replica con el DNA bacteriano. De la misma forma, Jiménez *et al* (2017), describen la presencia de un plásmido de alrededor de 50 Kb, que coincide con lo reportado por Fretaig en el mismo año, en donde sugiere que los fragmentos plasmídicos que le confieren la resistencia a los antibióticos deberían de ser mayores a 35 Kb, además, Jiménez *et al.*, (2017) encontró en cepas de *E. coli* integrones clase I, que están estrechamente relacionados a la diseminación de la resistencia antimicrobiana en Gramnegativos (Gillins, 2014). Mosquito y colaboradores en 2011, describen que los integrones tipo I y II contienen genes de resistencia a los antibióticos *sul1*, así como *dfrA1*.

Patrones de asociación de genes de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* periodontal

En cuanto a los patrones de asociación de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *E. coli*, se encontró que el patrón más frecuente fue el de resistencia a tetraciclina-gentamicina (*tetA-aac(3)-IV*, cuadro 3). Conforme a lo revisado en la literatura, estos datos son semejantes a los reportados por Boue y colaboradores (2019), en donde se encontraron 57 cepas con patrones de resistencia variables, en donde la frecuencia más

alta fue para el patrón conformado por la tetraciclina, aminoglucósidos (gentamicina) y, betalactámicos con una frecuencia del 29% (n=17).

Por otro lado, Mejía *et al* (2017) reportaron 34 cepas con patrones de resistencia similares, en donde la mayor frecuencia la presentaron los patrones conformados por tetraciclinas, aminoglucósidos, betalactamasas [gen *blaSHV*] y gentamicina [gen *aac(3)-IV*], cloranfenicol y estreptomicina. Además, se encontraron 7 cepas sin ninguna carga genética que confiera resistencia a los antibióticos, dato similar a lo encontrado en este estudio (5 cepas).

La presencia de los diferentes patrones de resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli* periodontales, refleja la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones más agudas o crónicas, por lo que es importante establecer medidas de prevención y de monitoreo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos para mejorar las alternativa de tratamiento de las infecciones (OMS, 2001).

CONCLUSIONES

- El diagnóstico clínico más frecuente en los pacientes estudiados fue la Periodontitis Moderada Generalizada (PMG), seguido de Periodontitis Aguda Generalizada (PAG).
- Las cepas de *E. coli* periodontales presentaron genes de resistencia a la estreptomicina, gentamicina, sulfonamidas, betalactámicos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprim y quinolonas.
- Los genes con mayor frecuencia fueron los que codifican para la tetraciclina (*tetA*), trimetoprim (*dfrA1*) y gentamicina (*aac(3)-IV*), mientras que los menos frecuentes fueron *blaSHV* (betalactámico) y *cmIA* (cloranfenicol).
- Se encontraron 11 patrones de asociación de genes de resistencia a los antibióticos, de los cuales los más frecuentes fueron tetraciclina-gentamicina (*tetA- aac(3)-IV*) y estreptomicina-gentamicina-tetraciclina (*aadA1, aac(3)-IV, tetA*).
- Dada la amplia detección de los genes que codifican para la multirresistencia de las bacterias periodontales, es de suma importancia realizar la prueba del antibiograma para una eficiente administración de los antibióticos.

REFERENCIAS

Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2005;187(6):1923-1929.

Albandar J. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent. Clin North Am.* 2005; 49:517-532.

Aguado J, Lumbreras C. Infecciones por enterobacterias, *Medicine.*1998; 7(36):22-28.

Alvear F, Velez M, Botero L. Ministerio de Salud. Estudio Nacional de Salud Bucal *Rev. Fac. Odontol. Universidad Antioquía.* 2010; 22(1):109-116

Ardilla C. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Av. Periodon implantol.* 2010; 22(1): 27-35.

Armitage G. Classifying periodontal diseases a long standing dilemma. *J Periodontol.* 2000; 30: 9-23.

Bailey J, Pinyon J, Anatham S, Hall R. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic resistance determinants. *J Med Microbio.* 2010; 59:1331-1339

Bascones-Martinez A. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Av periodontol Implantol.* 2005; 17(3): 63-72

Benton B, Breukink E, Visscher I, DeBabov D, Lunde C, Janc J, Mammen M, Humphrey P. Telavancin inhibits peptidoglycan biosynthesis through preferential targeting of transglycosylation: evidence for a multivalent interaction between telavancin and lipid II. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2007; 29: 51-52.

Blanchard A. Bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones. *Chem. Biol.* 2004; 11: 565–573.

Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *J Antimicrob.* 2004; 48(1): 1–14.

Botero A, Alvear F, Vélez M, Botero L, Velásquez H. Evaluación de los enfoques terapéuticos para las varias formas de enfermedad periodontal. Parte III: Prevalencia de Bacilos entéricos y levaduras. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 2008; 20(1):72-80

Boucher Y, Labbate M, Koenig J, Stokes H. Integrons: mobilizable platforms and promote genetic diversity in bacterias. *Trends Microbiol.* 2007; 1:301-309.

Boue L, Sanchez S, Garbey L, Rondón N, Castellanos I. Resistencia antimicrobiana de la *Escherichia coli* en la infección de tracto urinario. *Rev Información Científica.* 2019; 98(6). 758-764.

Brosius J, Palmer M, Kennedy P, Noller F. Complete nucleotide sequence of a 16s ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1978; 75(10): 48-54.

Camarena A, Anaya Y, Montaña M, López J. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *Rev. Periodonotol Universidad Autónoma de Mexicali.* 2016; 17(54): 1374-1378

Cardenas M, Cruz O, Gándara J, Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: “la inteligencia” de las bacterias. *Elementos.* 2014; 94: 35-43.

Chávez V, Ramirez M, Silva J, Cervantes C. Resistencia bacteriana a quinolonas determinantes codificados en plasmidos. Rev Microbiol Mol. 2015; 34(1): 232-260.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. 2001. J. Microbiol.

Conza JA, Gutkind GO. Integrons: gene collectors. Rev Argent Microbiol. 2010; 42: 63-78.

Contreras A, Ramirez J, Cruz E. La moxifloxacina como coadyuvante en el tratamiento de las periodontitis. Rev. Clin. Periodontodoncia Implantol Oral. 2010;7(3):200-2008

Courvalin P, Lecqlerc R, Bingen, R (2006). Antibiogramme 2^a ed. Paris Editions, ESKA.

Escudero-Castaño N, Perea-Garcia Ma, Bascones-Martinez A. Revisión de la periodontitis crónica: evolución y su aplicación clínica. Av periodon Implantol. 2008; 20(1): 27-37.

Farias F. Enfermedad y microorganismos periodontales patógenos. Dpto. Ciencias Morfopatológicas. 2012;4-12.

Garza- Ramos, Silva-Sanchez, Martinez-Romero. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Rev Salud Publica. 2009; 53: 439-446.

Grünbaum F. Resistencia a aminoglucósidos en enterobacteriaceae. U. Barcelona. 2011; 31-3

Gillings M. Intrngons: Past, Present and Future. Department of Biological. 2014: 78(2): 257-277.

Goñi M. Antibiotics aminolucosids. Treballs de la societat catalana de microbiologia. 2004; 55:107-19.

Haffaje AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000. 1994; 91-93

Herrera D, Alonso B, Leon R, Sanz S, Roldan S. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm, J. Clin. Periodontol. 2008; 35(8): 45-66.

Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimetoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food producing animals. Lett Appl Microbiol. 2009; 49(6): 7-43.

Jimenez-Mejia R. Guduño L., Aguilar J, Loeza P. Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacan, México. Rev mexicana Cienc Pecu. 2016; 8(4): 387-396.

Karami N, Nowrouzian F, Adlerbeth I, Wold AE. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50:156-161.

Leach KL, Swaney SM, Colca JR, McDonald WG, Blinn JR, Thomasco LM, Gadwood RC, Shinabarger D, Xiong L, Mankin AS. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. Mol. Cell. 2005; 26: 393-402.

Eisenstein B. (1994). Diseases caused by Gram-negative enteric bacilli. Harrison's principles of Internal Medicine (13th edition). 1994; 661-669.

Leyvam S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. Biol. Soc. Qum. 2008; 26(1): 4-5.

Magray M, Kumar A, Rawat A, Srivastava S. Identification of Escherichia coli through análisis of 16S r RNA and 16S-23-S rRNA internaltranscribed spacer región sequences. Bionifformation. 2011; 6(10): 370-371

Mammeri H, Van de Loo M, Poirel L, Martines L, Nordmann P. Emergence of plsamid mediated quinolone resistance in Escherichia coli in Europe. Antimicrobial agemts and chemotherapy. 2005;49: 71-76.

Matesanz P, Matos R, Bascones A. Enfermedades gingivales: una revisión de la literatura. Av periodontol. 2008; 20(1): 11-25.

Martínez A, Ruiz E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Av Periodon Implantol. 2005; 17(3): 147-156

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the hot response. Nature 2006; 70(98): 39-44.

Moli J, Cordero E, Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos y polimixinas. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2009; 27(23):178-188.

Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi F, Ranjbar R. Uropathogenic Escherichia coli in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2013; 12(8). Pp 1-7

Moredo F, Vigo G, Cappuccio J, Piñeyro P, Perfumo C, Giacoboni G. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 2007; 39(4):20-33.

Mosquito S, Ruiz J, Bauer J, Ochoa T. Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(4):648-56

Napoles N, García M, Gómez M, Melis S. Enfermedad periodontal en la tercera edad. 2006;10(1):1-5

OMS. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Rev Panam Salud Publica*. 2001; 10: 284-93.

Opazo A, Mella S, Dominguez M, Bello H, González R. Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a los antimicrobianos. *Rev Chil Infectol*. 2009; 36(6):499-503.

Oromí D. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *U. Barcelona*. 2000; 36(10): 367-369.

Pereyra T, Yáñez I, Reyes L. Prevalencia de periodontitis causada por sobreinfecciones en pacientes con infección por virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Mexicana de periodontol*. 2010; 1(1): 2-6.

Pimentel B, González M, Alfonso M, Pérez A, Rodríguez M. Tabaquismo y enfermedad periododental. *Rev. Cubana Med., Milit*. 2002;31(2):94-9.

Poirel L, Carattoli A, Bernabeu S, Brudererm T, Frei R, Nordmann P. A novel in Q plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(8):1594-1598.

Pérez-Trallero E, Vicente G. Tetraciclinas, sulfonamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(2):122–130

Randall L, Cooles S, Osborn M, Piddock L, Woodward M. Antibiotic resistance genes introns and multiple antibiotics resistance in thirty five serotypes of *Salmonella* entérica. *J. of antiicrobiol chemotherapy*. 2004;53: 208-216

Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003;51: 1109–1117.

Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica. Mex*. 2012: 44: 464-475

Sanz M, Van Winkelho A, Herrera D, Dellelijn-Kippun N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Oral science*. 2000;108: 383-392.

Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cleckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *Microbio Rev*. 2009; 28:519-542.

Shaddox LM, Goncalvez PF, Vovk A, Allin N, Huang W, Hou W, Aukhil I, Wallet SM. LPS-induced Inflammatory Response after Therapy of Aggressive Periodontitis. *J Dent Res*. 2013; 92(8):702-708

Slots J, Rams F. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbial Immunol.* 1990; 5: 149-154.

Somma M, Querci M, Van G. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimento. 2007;1-24.

Souto R, Andrade A, Uzeda M, Colombo A. Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Dpto. de microbiología, Brasil.* 2006; 37(3):208-210.

Souto R, Colombo A. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Dpto. de microbiología, Brasil.* 2008;53:155-160.

Steffens N, Gamonal J, Gajardo M. Ocurrencia de bacilos Gramnegativos no fastidiosos y levaduras en la microbiota subgingival de pacientes chilenos con periodontitis. *Rev. Mexicana de periodontol.* 2006; 10(3):119-125.

Straus S, Hancock R. Mode of action of the new antibiotic for gram positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptide. *Biochim. Biophys.* 2006;1758: 1215–1223.

Strohl WR. *Biotech Antibiotics.* Marcel Dekker Inc., New York, USA. 1997.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J, Med,* 2006; 119(3): 62-70

Toro C, Farfán M, Flores O, Navarro N, Mora G, Prado V. Genetic Alaysis of antibiotic resitance determinants in multidrug resistant -Shigella from Chilean children, 2005; 133: 81-86.

Van TT, Chin J, Chapman T, Tran L, Coloe E. Safety of raw meat amd shelfish in Vietnam: An análisis os Escherichia colli isolations for antibiotic resistance and virulence genes. Int. J. of food Microbio. 2008; 24:217-233.

Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ. Plant Biochemistry Assays for Bioactivity. 1991;47-67

Vignoli R, Varela G, Mota M, Cordeiro F, Power P, Ingold E. Enteropathogenic Escherichia coli strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. J Clin Microbiol. 2005; 43:2940-2943.

Warsen A, Krug M, LaFrentz S, Stanek, D, Loge F. Call D. Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and microarrays. Applied and Enviromenal Microbiology. 2004;70: 4216-4221.