



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“FRECUENCIA DE LOS INTEGRONES CLASE I Y II,
ASOCIADOS A GENES DE RESISTENCIA A QUINOLONAS,
SULFAMETOXAZOL, Y DESINFECTANTES EN CEPAS
PERIODONTALES DE *Escherichia coli*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

JENNEFER PALOMA HERRERA GABRIEL

DIRECTOR DE TESIS

Dr. ERIC MONROY PÉREZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado 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.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis padres, por apoyarme en todo momento a lo largo de la carrera. Por los desvelos, las preocupaciones y el esfuerzo que hicieron todos los días por verme convertida en una profesionista. Todos los sacrificios por los que pasaron han valido la pena y quiero decirles que este logro es de ustedes.

A mis hermanos, por orientarme y ser mis compañeros de vida, siempre estaré agradecida por todo lo han hecho por mí.

A mis amigos, por todas las experiencias juntos, las prácticas de campo, las clases y todos los momentos de risas que me regalaron, sin ustedes la universidad no hubiera sido lo mismo.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el doctor Eric Pérez Monroy por su paciencia y tiempo dedicado en la realización de este proyecto. Sus conocimientos y observaciones fueron mi guía para poder ver concluido mi trabajo de investigación.

A la doctora Gloria Luz Paniagua Contreras por permitirme ser parte de su laboratorio, sin duda una de las mejores experiencias que tuve en la facultad. Sus consejos y enseñanzas las guardaré para siempre.

Al comité revisor por sus observaciones y felicitaciones, las cuales me motivaron para seguir adelante.

Muchas gracias por todos sus consejos y enseñanzas.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 Periodontitis.....	8
2.2 Enterobacterias.....	9
2.3 Clasificación enterobacterias.....	10
2.4 <i>Escherichia coli</i>	11
2.5 Patotipos de <i>E. coli</i>	12
2.6 Factores de virulencia en <i>E. coli</i>	15
2.7 Resistencia bacteriana.....	16
2.8 Mecanismos de resistencia en <i>E. coli</i>	17
2.9 Elementos genéticos móviles.....	18
2.9.1 integrones.....	19
2.9.2 plásmidos.....	20
2.9.3 Transposones.....	21
2.9.4 Locus <i>mar</i> y <i>marO</i>	21
2.10 Genes de resistencia en <i>Escherichia coli</i>	22
2.11 Mecanismo de acción de los antibióticos.....	22
2.12. Betalactámicos.....	22
2.13 Cloranfenicol.....	23
2.14 Aminoglucósidos.....	23
2.15 Tetraciclinas.....	24
1.16 Quinolonas.....	24
1.17 Macrólidos.....	25
1.18. Glucopéptidos.....	25
1.19 Sulfonamidas.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. ANTECEDENTES.....	26
5. OBJETIVO GENERAL.....	29
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30

6.1 Origen de las cepas.....	30
6.2 Extracción de ADN de <i>E.coli</i>	30
6.3 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR.....	31
6.4 Detección del gen <i>floR</i>	31
6.5 Detección del gen <i>sul2</i>	31
6.6 Detección del gen <i>sul3</i>	32
6.7 Detección de los genes <i>intl1</i> e <i>intl2</i>	32
6.8 Detección de los integrones clase 1 y 2.....	32
6.9 Detección del gen <i>qacEΔ1</i>	33
6.10 Detección del locus <i>MarR</i> y <i>MarO</i>	33
6.11 Electroforesis y visualización	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Frecuencia de los genes.....	35
7.2 Visualización en electroforesis.....	36
8. DISCUSIÓN.....	40
8. 1 Infecciones periodontales.....	40
8.2 Resistencia a los antibióticos.....	40
8.3 Detección de <i>floR</i>	41
8.4 Identificación de <i>sul2</i>	41
8.5 Identificación de <i>sul3</i>	42
8.6 Identificación Gen <i>qacEA1</i>	42
8.7 Identificación integrón clase I.....	43
8.8 Identificación integrón clase II.....	43
8.9 Región variable integrón clase I.....	43
8.10 Región variable integrón clase II.....	44
8.11 Identificación locus <i>marR</i> y <i>marO</i>	44
9. CONCLUSIONES.....	45
10.REFERENCIAS.....	46

1. RESUMEN

- La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica ocasionada por la respuesta inmune del hospedero a la infección de numerosas bacterias orales, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, y también a bacterias asociadas como *Escherichia coli*. La periodontitis se caracteriza por la destrucción de los tejidos que rodean los dientes debido a la placa dentobacteriana, que genera con el tiempo la pérdida progresiva del hueso alveolar y por consiguiente la pérdida de los dientes. El tratamiento de las infecciones periodontales se ha complicado recientemente debido a la selección de bacterias resistentes a los antibióticos. El objetivo de este estudio fue establecer la frecuencia de genes de resistencia a los antibióticos, como las quinolonas, sulfametoxazol, integrones, el locus *mar* y desinfectantes en cepas periodontales de *E. coli*. Se analizaron 96 cepas de *Escherichia coli* previamente aisladas de pacientes con enfermedad periodontal que acudieron a la clínica de endoperiodontología de la FES Iztacala. Las cepas de *E. coli* pertenecen al cepario del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala. El DNA bacteriano fue extraído por ebullición. La identificación de *E. coli* se realizó por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) mediante amplificación del gen 16SrRNA. Los genes de resistencia a quinolonas (*floR*), sulfametoxazol (*sul2* y *sul3*), integrones (*ntl1* e *intl2*) el locus *marR* y *marO* y desinfectantes (*qacEA1*) se realizó igualmente por PCR. El 31.2% (n=30) de las cepas fue portadora de *floR*, 45.8% (n=44) de *sul2*, 20.8% (n=21) de *sul3*, 34.3% (n=33) de *intl1*, 5.2% (n=5) de *intl2*, 52.8% (n=47) de *marR* y *marO* y 83.3% (n=80) de *qacEA1*. La elevada distribución de los marcadores de resistencia a quinolonas, sulfametoxazol, integrones, el locus *mar* y desinfectantes en las cepas periodontales de *E. coli* representa un factor de riesgo importante para la agudeza o cronicidad de las infecciones de los pacientes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad de la cavidad bucal que involucra la pérdida progresiva del hueso alveolar y se acompaña de la destrucción de los tejidos que rodean los dientes debido a una reacción inflamatoria que resulta de la respuesta inmune del hospedero a las bacterias orales y que puede derivar en la pérdida del diente (Ga & Chong 2015; Ko *et al.*, 2020). Este proceso inflamatorio ha sido estudiado por décadas con respecto a su naturaleza, factores de riesgo y factores etiológicos específicos o no específicos que incluyen la microbiología subyacente (Helmi *et al.*, 2019).

Bacterias Gram negativas anaerobias involucradas en la biopelícula subgingival tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Ac), *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus* y *Actinomyces* spp. en conjunto con los antecedentes clínicos como, la mala higiene dental, enfermedades sistémicas, consumo de cigarrillo, alcohol y condiciones sociodemográficas como el nivel educativo, derivan en el desarrollo de esta enfermedad (Macín-Cabrera *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2017).

La periodontitis crónica es la más frecuente de las formas de periodontitis y se presenta normalmente después de los 35 años. Se requiere de una gingivitis preexistente para su desarrollo, sin embargo no todas las gingivitis derivan en periodontitis. Los estudios señalan que el progreso de esta enfermedad es lento y continuo y la severidad está relacionada con la acumulación de placa dental (Rojo *et al.*, 2011).

En conjunto la gingivitis y periodontitis en México, su incidencia se reporta en 60 % en mujeres y 38% en hombres. En la población mundial su forma severa se presenta entre un 5 y 15%. El grado de destrucción está directamente relacionado con factores locales, ambientales y sistémicos que aumentan la susceptibilidad en el hospedante, tales como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares entre otras, las cuales tienen una alta prevalencia en México y

que hace que sea más probable la complicación de la periodontitis en este país (Plaza *et al.*, 2014).

Las acumulación de placa dental es el paso clave para el desarrollo de la enfermedad periodontal y además de las bacterias ya mencionadas, existen estudios que describen la alta prevalencia de enterobacterias en aislados periodontales, las cuales podrían complicar el cuadro clínico de los pacientes y la respuesta a la terapia antimicrobiana (Medina, 2010). Algunos géneros de enterobacterias reportados son: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Escherichia coli*. (Moreno, 2012; Handal *et al.*, 2003).

2.2 Enterobacterias

Las especies de este género son bacilos Gramnegativos que forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Fermentan la glucosa, son aerobios y anaerobios facultativos, reducen nitratos a nitritos, oxidasa negativa y catalasa positiva. Comparten un antígeno denominado antígeno común enterobacteriano, tienen un tamaño intermedio de 0.3 a 1.0 x 1.0 a 6 µm, pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos y no forman esporas. Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, sobre todo intestinales y urinarias, así como un tercio de todas las bacteriemias (Martínez, 2011; Pérez *et al.*, 2014)

La envoltura celular de las bacterias Gramnegativas, está constituida por dos membranas, una interna que consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas; y una membrana externa compleja que está compuesta por peptidoglucano junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas, poseen una doble capa de fosfolípidos que incluye al lipopolisacárido (LPS) o endotoxina, que es un importante factor de virulencia. Lipoproteínas de anclaje que entrecruzan la membrana externa con el peptidoglucano, y, proteínas porinas multiméricas que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos y otras proteínas de la membrana externa (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010).

Algunas enterobacterias como *Shigella* spp., *Salmonella* y *Yersinia pestis* se consideran patógenos primarios, mientras que *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., etc. forman parte de la microbiota normal, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas (Fariñas & Martínez-Martínez, 2013).

2.3 Clasificación Enterobacterias

Los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* se han clasificado en función de sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación ADN-ADN y secuenciación del ARNr 16S (Tabla 1). La clasificación epidemiológica o serológica de las enterobacterias se basa en tres grandes grupos de antígenos: los polisacáridos O somáticos, los antígenos K de la cápsula (polisacáridos específicos de tipo) y las proteínas H de los flagelos bacterianos, de esta forma, la expresión o ausencia de estos antígenos va a determinar los serotipos y serogrupos de cada especie bacteriana (Pérez *et al.*, 2014).

En estudios microbiológicos en pacientes con periodontitis se ha detectado la presencia de enterobacterias que muestran gran resistencia a la terapia antimicrobiana, esto se debe principalmente a la gran facilidad con que las bacterias Gramnegativas adquieren genes de resistencia a través de distintos mecanismos o por mutaciones cromosómicas (Nicoloff *et al.*, 2006).

Tabla 1. Principales géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae*

Género	Especie
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> (patotipos; EPEC, ETEC, EAEC, EHEC y EIEC)
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> Serotipos: Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Paratyphi A, B y C
<i>Shigella</i>	<i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. granulomatis</i> , <i>K. pneumoniae</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i>
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i>

Proteus

P. mirabilis

Morganella

M. morganii

2.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gramnegativa ampliamente distribuida y es el anaerobio facultativo más numeroso que habita el intestino de animales formando parte de la microbiota normal. Es la más importante de las enterobacterias y la descrita con más frecuencia como causa de patología en los seres humanos. Puede ser aislada fácilmente de muestras clínicas y ser incubada en medio general o específico a 37°C bajo condiciones anaerobias. En aislados fecales se siembra con mayor frecuencia en agar MacConkey o agar Eosina azul de metileno (EMB), los cuales permiten diferenciar a la familia *Enterobacteriaceae* mediante la morfología colonial. (Nataro & Kaper, 1998; Vives-Soto & Difabio, 2010).

Normalmente *E. coli* establece una relación simbiótica con su hospedero y tiene una función importante en la estabilidad de la microbiota intestinal, sin embargo, las infecciones causadas por *E. coli* extraintestinales son la principal causa de morbilidad y mortalidad (Miranda-Estrada *et al.*, 2017).

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de la microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez-Angeles, 2002).

Esta bacteria es considerada como un reservorio y transmisor de genes a otros miembros de la microbiota humana. En los últimos años, se ha registrado un aumento importante de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos. Esta resistencia, al estar codificada principalmente en

elementos genéticos móviles, facilita su diseminación en diferentes ecosistemas, incluyendo el humano (Umpierréz *et al.* 2020; Guillén *et al.*, 2014).

2.5 Patotipos de *E. coli*

Como especie a la *E. coli*, se le conocen al menos 5 patotipos causantes de síndromes diarreicos:

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Causante de la diarrea del viajero, este patotipo suele presentarse con frecuencia en zonas tropicales, siendo niños menores de tres años los más afectados. El cuadro clínico es provocado por la acción de 2 tipos de toxinas: una termolábil y otra termoestable. Provoca diarrea desde leve a grave, produciendo en grupos vulnerables cuadros de deshidratación y desequilibrio hidroelectrolítico que en algunos casos puede conducir a la muerte. El periodo de incubación es variable, desde horas hasta 2 días. Los síntomas generalmente son: diarrea acuosa, espasmos abdominales, astenia, náuseas y vómitos ocasionales, así como febrícula. El tratamiento se basa en la hidratación con sueros orales. En episodios de moderados a graves se recomienda el uso de antibióticos como ciprofloxacino, rifaximina o azitromicina (Gutiérrez *et al.*, 2014).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

Denominada así por la capacidad de producir colitis hemorrágica, este patotipo se caracteriza por compartir caracteres clínicos, patogénicos y epidemiológicos con la cepa O157:H7 y un subgrupo de *E. coli* verotoxigénico (VTEC) o *E. coli* productor de toxina Shiga. *E. coli* O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de *E. coli* que comparten el mismo potencial patogénico. Produce cuadros de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica (PTT) (Rivero *et al.*, 2004 & Huapaya *et al.*, 2001).

E. coli verotoxigénica (VTEC) presenta las siguientes características que determinan su virulencia: a) Producción de verocitotoxinas : verocitotoxina 1 (VT1) y verocitotoxina 2 (VT2), así denominadas por su efecto citopatogénico sobre células Vero20. Se denominan también Shiga-like toxins (SLTs) por su relación biológica y estructural con la toxina Shiga sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo I o, Shiga toxins (Stx). Una vez fijada a su receptor las verocitotoxinas son internalizadas a las células blanco (endoteliales, epiteliales y hematíes que presentan en su membrana el grupo glicolipídico) por un mecanismo de endocitosis (Rivero *et al.*, 2004).

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC)**

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. Los síntomas característicos son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea. Las cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Rodríguez-Angeles, 2002).

***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

E. coli enteropatógena fue la primera en describirse y es tal vez uno de los microorganismos más estudiados. La infección con EPEC es una de las causas más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo. La evolución de esta patología se caracteriza por una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (adherencia y eliminación) La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito. La aparición de diarrea de tipo acuoso es otra característica típica, que puede ocurrir con diversos grados de intensidad, además de vómito y fiebre (Vidal *et al.*, 2007).

***E. coli* enteroagregativa (EAEC)**

Se denomina así por su capacidad para adherirse in vitro a células HEp-2, formando un característico patrón de adherencia agregativo. Este patrón de agregación se ha asociado a la presencia de un plásmido de 60-65 KDa, en el cual también se hallan codificados otros factores de virulencia (Ruiz-Blázquez *et al.*, 2005).

La *E. coli* enteroagregativa (EAEC) está asociada con casos de diarrea crónica y persistente en países en desarrollo, además de ser uno de los patógenos oportunistas más relevantes que afecta a los pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Aún no se conoce exactamente el mecanismo de esta infección, sin embargo estudios han descrito un modelo de las 3 etapas de la infección; 1. adherencia inicial a la superficie de la mucosa, 2. formación de biopelículas y 3. inducción de respuesta inflamatoria y liberación de toxinas (Taborda *et al.*, 2018).

***E. coli* de adherencia difusa (DAEC)**

Este patotipo se caracteriza por no formar microcolonias cuando se adhieren a células HEp-2, lo que le da el nombre de adherencia difusa. Estudios morfológicos han descrito que las cepas de adherencia difusa (DAEC), generan un fenotipo inusual de adherencia celular sobre el cultivo de células HEp-2, observándose la inducción de algunas proyecciones de la membrana celular. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. La patología causada por DAEC se caracteriza por la alteración histopatológica en el intestino, conocida como lesión A/E (adherencia y borramiento), lesión que se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito (Riveros *et al.*, 2011; Rodríguez-Angeles, 2002).

2.6 Factores de virulencia en *E.coli*

Los factores de virulencia en *E. coli* le permite colonizar e infectar al hospedero. Entre estos factores se encuentran los implicados en la adherencia de las bacterias a las células o adhesinas (fimbrias tipo 1 y fimbrias tipo P), factores que permiten evitar o sobrevivir a los sistemas de defensa del hospedero (como las cápsulas y lipopolisacáridos), mecanismos de adquisición de nutrientes (sideróforos), proteasas, invasinas y toxinas (hemolisina y factor citotóxico necrosante) y puede variar entre los diferentes síndromes o tipos de infección (Soto, 2006).

Fimbrias tipo 1: Las fimbrias están formadas por filamentos de polímeros constituidos por subunidades proteicas, donde se encuentran estructuras moleculares diferenciadas llamadas adhesinas que se unen a receptores específicos situados en las membranas de las células epiteliales del hospedante. Su estructura es muy similar a pelos que se extienden en la superficie de *E. coli* y otros géneros de enterobacterias. Son necesarias para la colonización de las vías urinarias por *E. coli* uropatógena y su presencia aumenta la capacidad de infección de la bacteria, además de aumentar su persistencia (Risco *et al.*, 2010; Gunther *et al.*, 2001).

Cápsula: la cápsula es uno de los factores de virulencia que las bacterias como *E.coli* han desarrollado y que le permiten colonizar y sobrevivir a eventos como desecación, la opsonización, la fagocitosis y efectos bactericidas. Contiene el antígeno K, el cual es un polisacárido ácido situado en la superficie celular. El antígeno K1 en *E. coli* está asociado con el desarrollo de meningitis neonatal, bacteriemia e infección urinaria (Merino, 2018; Ardila-Medina, 2010).

Toxinas: se han reportado una gran variedad de toxinas en *E. coli*, entre ellas la α -hemolisina, capaz de lisar eritrocitos ocasionando la liberación de hierro y otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. El factor citotóxico necrotizante induce la apoptosis de células epiteliales de vejiga in vitro y disminuye la fagocitosis por polimorfonucleares. La toxina secretada autotransportadora tiene actividad tóxica contra líneas celulares de origen renal o de vejiga (Faleiro, 2010).

Sideróforos: La captación de hierro de las bacterias es indispensable para sobrevivir. Existen distintos mecanismos mediante los cuales estas pueden aprovechar el hierro presente en el hospedero, entre ellos los sideróforos; ligandos de hierro de bajo peso molecular que se

caracterizan por unir hierro con alta especificidad. Son producidos por muchas bacterias, y hongos. La expresión de esta molécula está condicionada a la falta de hierro libre en el ambiente, ya que cuando este se encuentra disponible para la bacteria, los genes que la codifican se encuentran apagados (Garrido, 2006).

Proteasas: Son enzimas que catalizan la degradación de proteínas al hidrolizar los enlaces peptídicos. Se encuentran presentes en todos los organismos vivos cumpliendo distintas funciones a nivel celular, entre ellas modulación y liberación de hormonas, proliferación y diferenciación celular, etc. Algunas bacterias patógenas oportunistas las producen y secretan como factor de virulencia que les facilita la colonización de diferentes nichos (Fullana, 2014).

2.7 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es un problema emergente a nivel mundial presente en diversas bacterias, en especial en *Escherichia coli*, que tiene altos porcentajes de resistencia a la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico (Mosquito *et al.*, 2014). Este problema está asociado al incremento en la mortalidad, hospitalización y altos costos en el cuidado de la salud (Hassoun-Kheir *et al.*, 2020). Su rápida propagación ha posicionado al sector salud en uno de los más grandes retos debido a la disminución de alternativas farmacológicas (Hao *et al.*, 2020).

Los antibióticos han sido prescritos como apoyo a la terapia mecánica para reducir la carga bacteriana a nivel subgingival. Sin embargo, algunas especies bacterianas han desarrollado resistencia antimicrobiana debido a la prescripción indiscriminada de antibióticos, en especial en Latinoamérica además de la gran facilidad con la que las bacterias pueden transferir elementos genéticos móviles a otras, en los que se almacenan genes que codifican para distintas moléculas o mecanismos capaces de interferir con el antibiótico y evitar su efecto (Alós, 2015; Cruz-Olivo *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha observado un incremento de la resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas debido a que son antibióticos de amplio espectro utilizados con frecuencia en el campo clínico. La resistencia a quinolonas en enterobacterias está dada con frecuencia por mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* que codifican la subunidad A de la ADN girasa y la subunidad A de la topoisomerasa IV (Machuca *et al.*, 2017). Cuando se comercializaron las

fluoroquinolonas a finales de la década de los ochenta del siglo xx, prácticamente todas las cepas de *E. coli* eran sensibles; hoy son resistentes el 34% de las cepas de hemocultivos en España (Alós, 2015).

Los β -lactámicos son los antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por enterobacterias. La frecuencia de bacterias resistentes se ha visto incrementada debido a la proliferación y diversificación de β -lactamasas, enzimas bacterianas con capacidad de hidrolizar y conferir resistencia a los β -lactámicos. La presencia de enterobacterias productoras de β -lactamasas cobra mayor relevancia debido a que los plásmidos portan los genes que codifican para estas enzimas, y van acompañados, por lo general, de genes de resistencia a aminoglucósidos sulfonamidas y tetraciclinas, y a que además, en estas cepas se suele asociar también resistencia a las quinolonas (Rivera *et al.*, 2014).

2.8 Mecanismos de resistencia en *E. coli*

El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es motivo de gran preocupación ya que dificulta el enfoque terapéutico de los pacientes infectados (Pérez *et al.*, 2011). Esta problemática se asocia principalmente al uso masivo de estos fármacos, además de la gran facilidad con la que las bacterias pueden transferir elementos genéticos móviles a otras, en los que se acarrean genes que codifican para distintas moléculas o mecanismos capaces de interferir con el antibiótico y evitar su efecto (Alós, 2015).

Algunos mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas se describen a continuación:

Presencia de β -lactamasas: las bacterias usan dos mecanismos para desarrollar resistencia contra los β -lactámicos, ya sea alterando la estructura de las proteínas de unión a la penicilina (PBP Penicillin Binding Proteins), para reducir la atracción entre los antibióticos y las PBPs o por la producción de β -lactamasa, que es una enzima capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico, lo que provoca la inactivación del antibiótico (Abushaheen *et al.*, 2020).

Bomba de eflujo: es un método de transporte activo que permite a la bacteria expulsar el antibiótico (aminoglucósidos) antes de que este pueda actuar. En este grupo de fármacos se

encuentran las fluoroquinolonas, cloranfenicol y tetraciclina. Existen bombas de eflujo multidrogo resistentes que están codificados por cromosomas de forma variable y su expresión en muchos casos es el resultado de mutaciones en genes reguladores. Por el contrario, las bombas que actúan en la salida de un fármaco específico, están codificadas por plásmidos y otros elementos genéticos móviles (transposones, integrones) que llevan genes de resistencia adicionales, y su adquisición se ve agravada por su asociación con la resistencia a múltiples fármacos (Poole, 2005).

Alteraciones en los sitios objetivo de los agentes antimicrobianos: este mecanismo es causado por la mutación de uno o más de los genes que codifican los objetivos primarios y secundarios de estos fármacos. Es el más común en la resistencia de fluoroquinolonas de alto nivel. La región donde surgen mutaciones en los genes que codifican la resistencia a las fluoroquinolonas son secuencias cortas de ADN conocida como la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) (Redgrave *et al.*, 2014).

Modificación de enzimas o inactivación de agentes antimicrobianos: Es una modificación enzimática, la adición de un acetyl, adenil o grupo fosfato de la enzima bacteriana hacia un sitio específico del antibiótico, ocurre para modificarlo químicamente e inactivarlo, haciéndolo incapaz de unirse al sitio objetivo. En la inactivación enzimática, la unión directa de las enzimas bacterianas a los antibióticos y su desintegración se produce principalmente por la acción de escisión hidrolítica de los antibióticos (Ramirez & Tolmasky. 2010).

2.9 Elementos genéticos móviles

Es a través de elementos genéticos móviles que una bacteria es capaz de transmitir genes de resistencia a otra. Estos han sido identificados y entre los más conocidos se encuentran los plásmidos autotransferibles o movilizables, transposones conjugativos y no conjugativos, ADN del bacteriófago, integrones y cassettes genéticos de resistencia. La transferencia de estos elementos entre diferentes bacterias puede ocurrir por conjugación, transformación o transducción, procesos básicos de transferencia horizontal de genes entre bacterias (González *et al.*, 2004).

2.9.1 Integrones

Definidos por Hall y Collis (1995) como un elemento dinámico que contiene los determinantes genéticos de los componentes de un sistema de recombinación específica de sitio que reconoce y captura genes en casetes móviles. El surgimiento y la evolución dentro de los integrones ha ganado mucha atención durante las últimas décadas debido a su relevancia con la resistencia a antibióticos. Estos elementos genéticos están compuestos, en su forma más básica, de 3 partes principales: el gen integrasa integrón (*intI*), un sitio adyacente de recombinación (*attI*) y el promotor (P_c) que permite la expresión de los casetes genéticos de resistencia que han sido integrados en el sitio *attI* (Figura 1). Esta estructura le permite acoplar fácilmente genes de resistencia bacteriana, factores de virulencia, nuevas funciones metabólicas, etc., lo cual otorga a la bacteria hospedadora una mayor capacidad para adaptarse a nuevas condiciones de supervivencia (Di-Conza & Gutkind, 2010; Zhu *et al.*, 2020).

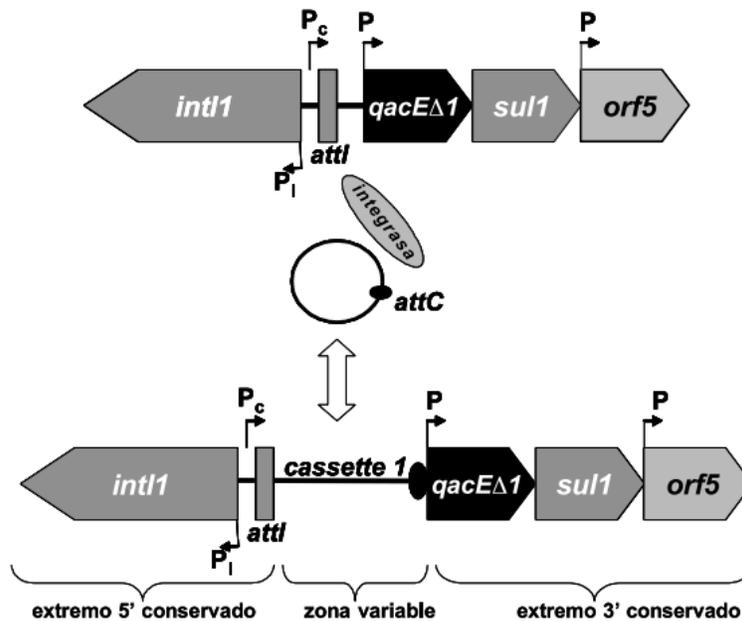


FIGURA 1. Representación esquemática de la estructura básica de un integrón y de la adquisición de casetes genéticos de resistencia. *intI1*: gen que codifica la integrasa clase 1; *attI*: sitio de recombinación del integrón en el cual los casetes son integrados; P_i : promotor que transcribe la integrasa; P_c : promotor que dirige la transcripción de los casetes integrados. *attC*: sitio de recombinación del cassette genético (esquema no dibujado a escala) (González *et al.*, 2004).

En la mayoría de los integrones clase 1 descritos hasta ahora existe un extremo 3' altamente conservado (3'CS) con los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5* que codifican resistencia, respectivamente, a compuestos de amonio cuaternario, a bromuro de etidio, a sulfonamidas y a una proteína con función desconocida. Los integrones de clase 1, 2 y 3 son los tres principales tipos de elementos genéticos móviles asociados con la resistencia bacteriana y han sido detectados principalmente en bacilos Gram negativos fermentadores, de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, y en algunos no fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (González et al., 2004).

2.9.2 Plásmidos

Los plásmidos conjugativos y movilizables son las estructuras extracromosomales de mayor importancia epidemiológica, responsables de la propagación horizontal de múltiples genes de resistencia (Redondo & Guillermina, 2007). Estos elementos genéticos son secuencias pequeñas y circulares de ADN autorreplicables que se encuentran fuera de las células procariontes y eucariotas, y son transferibles de una célula a otra a través de los 3 mecanismos antes mencionados (Transducción, Transformación y Conjugación) (Abdulrahman & Ghanem, 2018).

Actualmente se conocen diferentes tipos de plásmidos, por ejemplo los integrativos, los cuales tienen la capacidad de insertarse en el cromosoma bacteriano, rompiéndolo y situándose en su interior, quedando automáticamente su replicación bajo el control de los cromosomas bacterianos. Otro tipo de plásmidos son los conjugativos o sexuales, los cuales portan genes que codifican pilis en la superficie de la bacteria, y cuya función es la transferencia de los plásmidos de célula a célula. Este tipo de plásmidos está presente en *E. coli*, conocido con el nombre de factor F, y en *Pseudomonas*, en la que se le conoce con el nombre de plásmido K (Sánchez-B et al., 2012).

En las últimas 2 décadas, las tasas de resistencia a quinolonas han ido en aumento en prácticamente todo el mundo, en donde los elementos asociados a esta resistencia han sido los plásmidos, además de mutaciones cromosómicas en genes que codifican topoisomerasas de clase II o en los implicados en la permeabilidad o en la expulsión activa (Martínez-Martínez & Calvo, 2010).

2.9.3 Transposones

Un transposón es una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula. Cada uno acarrea uno o más genes que codifican para enzimas que hacen posible su transposición; esta puede causar mutaciones en el cromosoma bacteriano o modificar el ADN, arrastrando un gen codificador, rompiéndolo por la mitad o haciendo que desaparezca por completo, lo que propicia que en estos lugares se lleve a cabo una reorganización del genoma bacteriano (Sánchez *et al.*, 2012).

Actualmente se conocen dos tipos de elementos transponibles; los denominados elementos IS (Secuencias de Inserción); secuencias cortas de ADN (entre 750 y 1600 bp) que constan únicamente de genes que codifican las enzimas necesarias para la transposición y en ambos extremos una región pequeña de nucleótidos en orientación invertida, conocidas como “Inverted Repeats” (IR), estos elementos se nombran con el prefijo IS seguido por un número. Los transposones compuestos o clase 1 son elementos transponibles que contienen genes adicionales, aparte de aquellos requeridos para la transposición, como por ejemplo genes de resistencia a antibióticos, metales pesados, a marcadores catabólicos y/o a toxinas (Di Conza *et al.*, 2013).

2.9.4 Locus *marR* y *marO*

La baja o nula respuesta a los fármacos por las bacterias se atribuye generalmente a la adquisición de múltiples transposones y plásmidos que portan determinantes genéticos para diferentes mecanismos de resistencia. Sin embargo, las descripciones de los mecanismos intrínsecos que confieren resistencia han tomado relevancia en los últimos años. El primero de estos factores es la Resistencia a Antibióticos Múltiple (*mar*) codificada cromosómicamente por un locus en *Escherichia coli*. Estas mutaciones se han asociado a resistencias frente a tetraciclinas, cloranfenicol, penicilinas, cefalosporinas, puromicina, ácido nalidíxico y rifampicina. Este locus se encuentra formado por dos unidades transcripcionales colocadas de manera divergente que flanquean al operador *marO*. Un operón *marC*, que codifica a una supuesta proteína integral de la membrana interna sin ninguna función aparente, pero que parece contribuir al fenotipo Mar en algunas cepas. El otro operón comprende *marRAB*, que

codifica el represor Mar (MarR), que se une a marO y negativamente regula la expresión de *marRAB*, un activador (MarA), que controla la expresión de otros genes en el cromosoma, por ejemplo, el regulón mar y una proteína pequeña (MarB) de función desconocida. (Aleksun & Levi, 1997).

Estudios recientes han documentado la selección de mutantes de Mar, portadores de mutaciones en MarR MexR u otros loci homólogos en *E. coli*, *P. aeruginosa* y otros organismos durante la quimioterapia antimicrobiana. Estos datos apoyan el papel de Mar como un factor crítico hacia el fracaso de la quimioterapia antimicrobiana (Hao *et al.*, 2013).

2.10 Genes de resistencia en *Escherichia coli*

Estudios han reportado la presencia de genes de resistencia en *E.coli* (Sáenz *et al.*, 2004;) y en muchos casos la presencia de más de un gen, lo que ocasiona la multiresistencia bacteriana. Algunos de estos genes son: *floR* (fluoroquinolonas), *sul2* y *sul3* (sulfametoxazol), *aac(3)IV* (aminoglucósidos), *qacΔ1* (desinfectantes), los integrones clase 1 y clase 2 y el locus *marR* y *marO*, en donde se llevan a cabo mutaciones que permite a la bacteria resistir el efecto del antimicrobiano (Mosquito *et al.*, 2014; Nicoloff *et al.*, 2006).

2.11 Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antibióticos presentan distintos mecanismos mediante los cuales inhiben el crecimiento bacteriano (bacteriostático) o causan su muerte (bactericida), algunos de estos son: Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, bloqueo de la síntesis de factores metabólicos, Inhibidores de β-lactamasas, alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos, alteración de la membrana citoplásmica e inhibición de la síntesis proteica, entre otros (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

2.12 Betalactámicos

Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Actúan principalmente mediante 2 mecanismos:

inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gramnegativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. Se recomiendan para infecciones causadas por bacterias Grampositivas, Gramnegativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmas porque estos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia* (Suárez & Guidol 2009).

2.13 Cloranfenicol

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que es producido por diversas especies del género bacteriano *Streptomyces*. Actualmente no se prescribe como medicamento de primera elección, debido a su toxicidad sobre células sanguíneas y médula ósea, además de producir reacciones adversas importantes como el síndrome del niño gris en prematuros y recién nacidos, caracterizado por vómitos, letargia, trastornos respiratorios, cianosis, distensión abdominal, hipotensión e hipotermia. La resistencia a estos antibióticos se ve mediada por diversos mecanismos, entre ellos por expulsión inespecífica y específica del cloranfenicol y resistencia mediante fosforilación. (Morales *et al.*, 2007).

2.14 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos se fijan en la subunidad 30S del ribosoma, provocando una alteración de la síntesis de las proteínas. Son efectivos contra bacilos Gram negativos aerobios, excepto *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*. La amikacina es la única activa sobre *Providencia*, y la tobramicina es la menos activa sobre *Serratia marcescens*. Suelen administrarse por la vía parenteral, intramuscular, subcutánea o intravenosa (la más recomendada) ya que estos antibióticos no se absorben a través del tubo digestivo. La vía oral sólo se utiliza, de forma no consensuada, para la descontaminación

digestiva. Los principales efectos indeseables son la nefrotoxicidad por necrosis tubular aguda, dependiente de la dosis, agravada por la hipovolemia y la prescripción de otros fármacos nefrotóxicos (Alfandari & Cannesson, 2016).

2.15 Tetraciclinas

Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina, tigeciclina, PTK 7906) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp. Actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias. Entran en el grupo de agentes bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos. La primera generación de tetraciclinas la constituyen los agentes más antiguos, los menos lipofílicos y los de menos absorción. La segunda generación se conforma por agentes con una mejor absorción y más lipofílicos. En la tercera generación se encuentran las glicinas, son análogos semisintéticos obtenidos tras modificar la posición 9 del anillo tetracíclico de los compuestos de las generaciones anteriores (Vicente & Pérez 2010).

2.16 Quinolonas

Las quinolonas actúan inhibiendo las topoisomerasas, enzimas indispensables en la síntesis del ADN y probablemente mediante la fragmentación del ADN cromosómico. La efectividad y el espectro aumentan de manera significativa cuando llevan un átomo de flúor en la posición 6, probablemente porque mejora la penetración en tejidos y la unión a las topoisomerasas bacterianas. La primera generación incluye antibióticos como ácido nalidíxico, ácido pipemídico poco usados en la actualidad. La segunda generación presenta una mayor actividad frente a Gramnegativos, incluida *Pseudomonas aeruginosa*, son activos frente a algunos patógenos atípicos, pero tienen moderada actividad frente a Grampositivos y nula frente a anaerobios. La tercera generación mantiene las características de las de segunda pero además tienen una mejor absorción por vía oral y mejor actividad frente a *P. aeruginosa*, Grampositivos y patógenos atípicos (Alós, 2009).

2.17 Macrólidos

El mecanismo de acción de estos antibióticos consiste en unirse a distintas bases del centro peptidiltransferasa del ARNr 23S. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido (especialmente entre el OH en posición 2' del azúcar desosamina) y determinadas bases del ARNr (especialmente, A2058 y A2059), numeración referida a *E. coli*. El número de la base varía en cada especie bacteriana. Se difunden a través de la membrana debido a su carácter lipofílico y probablemente por la existencia de un transporte activo dependiente del calcio (Ca). La actividad que desempeñan se considera bacteriostática contra la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, a concentraciones elevadas, frente a determinados microorganismos como *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, especialmente cuando se hallan en fase de crecimiento logarítmico, pueden comportarse como bactericidas (Cobos-Trigueros *et al.*, 2009).

2.18 Glucopéptidos

Son activos frente a bacterias Grampositivas. Actúan a nivel del peptidoglucano de la pared bacteriana. Bloquean la síntesis del peptidoglucano y del crecimiento bacteriano (se unen a las terminaciones peptídicas de la mureína, precursor del peptidoglucano, con lo que se impide su polimerización). Esta actividad bactericida es lenta, a diferencia de la de las betalactaminas. Los glucopéptidos son inactivos sobre las bacterias Gramnegativas, cuya pared es pobre en peptidoglucano. Son antibióticos reservados al uso hospitalario. Se pueden administrar en monoterapia o en asociación con aminoglucósidos y/o con rifampicina. Actualmente se utilizan como antibióticos para infecciones graves por estafilococos multirresistentes, por tanto, se consideran antibióticos de reserva y su uso se tiene que justificar (Henard & Rabaud. 2012; Rivera *et al.*, 2014).

2.19 Sulfonamidas

Las sulfonamidas son antibióticos sintéticos que se han utilizado ampliamente para tratar infecciones bacterianas y protozoarias en humanos, animales domésticos y acuicultura, desde su introducción a la clínica práctica en 1935. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la

biosíntesis de folato compitiendo con el sustrato natural ácido p-amino-benzoico por unirse a la dihidropteroato sintasa (DHPS), una enzima en la vía de síntesis del ácido fólico (Phuong-Hoa *et al.*, 2008).

La resistencia a sulfonamidas en *Escherichia coli* puede estar mediada por mutaciones en el gen cromosómico (folP) que codifica para la dihidropteroato sintetasa (DHPS), o con mayor frecuencia a partir de la adquisición de un gen de resistencia (*sul*), con el que existe una menor afinidad por la sulfonamida (Perreten *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha registrado un aumento en la resistencia bacteriana en cepas de *E. coli*, lo que conlleva a un incremento en la morbilidad de infecciones, así como al alto costo en la terapia farmacológica, por lo que el presente trabajo contribuye a determinar genes de resistencia a quinolonas, sulfametoxazol, desinfectantes, integrones clase 1 y 2, además del locus *MarR* y *MarO* presentes en las cepas de *E. coli* periodontales.

4. ANTECEDENTES

Vinué y colaboradores (2010) realizaron una caracterización de genes *sul* e integrones presentes en *E. coli*. Se analizaron un total de 135 cultivos de sangre de pacientes del Hospital San Pedro (Logrono, España) durante el año 2007 y se realizaron pruebas de susceptibilidad bacteriana mediante la técnica de difusión de disco. Los resultados de resistencia fueron los siguientes: ampicilina 54.8%, amoxicilina-ácido clavulánico 7.4%; cefoxitina 1.5%, cefotaxima 8.1%, ceftazidima 3%, aztreonam 5.2%, ácido nalidíxico 40.1%, ciprofloxacina 28.9%, gentamicina 14.9%, kanamicina 14.1%, estreptomina 47.4%, tetraciclina 35.5%, sulfamida 52.6%, Trimetoprim/sulfametoxazol 35.5%, cloranfenicol, 11.1% e imipenem 0%. Se reportó la presencia de integrones en el 40 % de los aislados. El integron clase 1 fue el más frecuente (39.3%). El gen *sul* fue reportado en 88.3 % (n=71) de las cepas de *E. coli*.

Solberg y colaboradores (2006) estudiaron la distribución de integrones que contienen casetes de resistencia para Trimetoprim-Sulfametoxazol en un total de 505 cepas de *E. coli*, aisladas de la orina provenientes de 228 mujeres con síntomas de infección en vías urinarias. El estudio reveló la presencia de 38 y 27 cepas portadoras de los integrones clase 1 y 2 respectivamente. En 93% (n=25) de los aislados resistentes a Trimetoprim-Sulfametoxazol fue encontrado el integron clase 1, lo que indica una correlación positiva.

Pastrana-Carrasco (2012) determinaron la frecuencia del gen *qacEΔ1* (resistente a desinfectantes) y caracterizaron la resistencia a biocidas en 240 cepas clínicas de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (EP-BLEE) causantes de infecciones nosocomiales. Reportaron que todas las cepas de EP-BLEE fueron resistentes a Clorhexidina y 80% a cloruro de benzalconio. El 68% de los aislamientos resistentes a biocidas presentó el gen *qacEΔ1*.

Céspedes y colaboradores (2010) estudiaron 153 cepas de enterobacterias en ocho hospitales de la ciudad de Bogotá de 2002 a 2005 con el fin de determinar la presencia de integrones clase 1 y la relación con su fenotipo de resistencia. De los aislamientos estudiados, 79.9% presentó integrones clase 1. Los genes más comunes fueron los que codifican resistencia a estreptomina (79.4%), trimetoprim (34.3%) y β-lactámicos (18.6%). Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la resistencia a estreptomina y trimetoprim con la presencia de integrones clase 1.

Yang y colaboradores (2010) secuenciaron un nuevo plásmido conjugativo (p42-2) que acarrea genes de resistencia a múltiples fármacos (*qxAB*, *fosA3*, y *floR*) aislado de la cepa 42-2 de *Escherichia coli*, previamente identificada en China. Encontraron que p42-2 es un plásmido quimera formado por un esqueleto de plásmido IncF básico con una gran región de multiresistencia. Esta región parece haber evolucionado a través de la integración de múltiples determinantes de resistencia de diferentes fuentes por la acción de recombinación. Esta asociación de genes de resistencia en el mismo plásmido significan un desafío en la terapia farmacológica.

Galván y colaboradores (2016) determinaron las características fenotípicas y genotípicas de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *E. coli* de cultivos de orina de pacientes de la comunidad en un laboratorio privado de la ciudad de Lima, Perú. Se evaluaron 53 cepas de *E. coli* por dos métodos fenotípicos: Jarlier y CLSI, el perfil de susceptibilidad se realizó mediante el disco de difusión en placa y la caracterización genotípica mediante PCR para los genes *bla*CTX-M, *bla*TEM y *bla*SHV. Las 53 cepas productoras de BLEE representaron el 16.30% del total de cepas de *E. coli*. El perfil de susceptibilidad evidenció alta resistencia a Ampicilina, Cefalexina, ceftriaxona(100%), Levofloxacin (87%), Norfloxacin (92%), Ciprofloxacino y Ácido Nalidíxico (94%), cefuroxima (96%), trimetoprim-sulfametoxazol (70%), Aztreonam (75%) y Tobramicina (85%). El gen *bla* más frecuente fue *bla*CTX-M (55%), seguido de *bla*CTX-M+TEM (24%), *bla*TEM (13%) y *bla*SHV (6%).

Caro y colaboradores (2007) realizaron un estudio de multirresistencia a antibióticos en infecciones urinarias en cepas *E. coli* mediante la técnica de disco de difusión en placa. Encontraron que los antibióticos con menor sensibilidad fueron ampicilina (43%), ácido nalidíxico (63,8%), trimetoprim-sulfametoxazol (69,3%) y ciprofloxacino (76,6%). El resto de los antibióticos estudiados presentó sensibilidades superiores al 80%.

Guiral *et al.* (2018) evaluaron la resistencia a los antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Se estudiaron un total de 39 aislados clínicos de EAEC y 43 de ETEC. Se determinaron las susceptibilidades de EAEC y ETEC frente a ampicilina, amoxicilina, ácido clavulánico, cefotaxima, imipenem, cloranfenicol, tetraciclina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, azitromicina y rifaximina a través del método de difusión de disco. Los resultados mostraron, para EAEC los siguientes porcentajes de resistencia más elevados fueron: ampicilina (AMP) 56.4%; trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 59%; tetraciclina (TET) 51,3%; ácido nalidíxico (NAL) 43,6%; ciprofloxacina (CIP) 23% y azitromicina (AZT) 23%. Mientras tanto, los mayores porcentajes de resistencia de los aislados clínicos de ETEC fueron AMP, 48,9%; AMC, 7%; CTX, 14%; SXT, 44,2%; CHL, 11,6%; TET, 39,5%; NAL, 44,2%; CIP, 21%; y AZT 14%. Para complementar el estudio, se determinó la presencia de distintos genes de resistencia, entre ellos *bla*ACT-20, el cual se detectó en dos

cepas, una EAEC y una ETEC. 6 cepas presentaron el gen *blaOXA-1* (cuatro EAEC y dos ETEC).

Sáenz y colaboradores (2004) analizaron distintos genes de resistencia dentro de integrones en 17 cepas de *E. coli* aisladas de animales, humanos y comida. Se encontraron un total de 15 genes de resistencia (*blaTEM1b*, *aphA1*, *aphA2*, *aadA1*, *tetB*, *tetA*, *cmlA*, *dfrA1*, *sul1*, *sul3* *sul2* *dfrA17* *aadA2*, *dfrA12*, y *aadA5*) distribuidos de forma homogénea en los aislados bacterianos. Para la determinación de los integrones clase 1 y 2 se analizó la presencia de los genes que codifican para la integrasa (*intl1* e *intl2*) presentes en los integrones. El gen *intl1* se encontró en 12 cepas y el gen *intl2* en 4. La región variable se analizó en estas cepas y se encontraron los genes *aadA1* (un aislado), *dfrA1* y *aadA1* (cuatro cepas), *dfrA1*, *aadA1*, *dfrA12*, *orfF*, *aadA2* (dos cepas), *dfrA12* más *orfF* más *aadA2* (dos cepas), and *dfrA17* más *aadA5* (tres cepas).

Kozak *et al.* (2008) evaluaron la distribución de los genes *sul1*, *sul2*, y *sul3* (responsables de la resistencia a sulfamidas) en cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* en cerdos y pollos de dos provincias importantes de Canadá. Para *E. coli* el análisis constó de 393 cepas de pollos y 311 de cerdos y para *Salmonella*, 13 cepas de pollos y 221 de cerdos. Los genes *sul1* y *sul2* se encontraron en *E.coli* y *Salmonella* de ambas especies animales. El gen *sul3* se detectó en las cepas de *E. coli* (solo en las cepas aisladas de pollos) y *Salmonella* en ambas especies. En el 3% de las cepas no tenía el gen *sul* detectable.

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer la frecuencia de genes de resistencia a quinolonas, sulfametoxazol, integrones, el locus *mar* y desinfectantes en cepas periodontales de *E. coli*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia de *Escherichia coli* en la enfermedad periodontal.
2. Identificar los genes de resistencia a fluoroquinolonas (*floR*), y sulfametoxazol (*sul2* y *sul3*) en las cepas de *E. coli*.

3. Estimar la presencia de los integrones clase I (*intl1*, class 1 integron región variable) y clase II (*intl2*, class 2 integron región variable), en las cepas de *E. coli*.
4. Identificar los genes de resistencia a desinfectantes (*qacEA1*) en las cepas de *E. coli*.
5. Determinar la frecuencia del locus *marR* y *marO* en las cepas de *E. coli*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de las cepas.

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron un total de 96 cepas de *Escherichia coli* previamente aisladas de pacientes con enfermedad periodontal que acudieron a la clínica de endoperiodontología de la FES Iztacala. Las cepas de *E. coli* pertenecen al cepario del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala.

6.2 Extracción del DNA de *E. coli* por ebullición.

Para la extracción del DNA bacteriano se tomó una asada de varias colonias de la *E.coli* crecidas en Agar MH (Mueller Hinton) siguiendo una trayectoria recta a lo largo del diámetro de la caja de Petri. El inóculo se depositó en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm estéril con tapón de rosca que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. Se suspendieron las bacterias en el agua por agitación en un Vórtex durante 20s y los tubos se llevaron a baño María (100 °C) durante 20 minutos, acto seguido se enfriaron en hielo (0 °C) por 10 min. Utilizando puntas estériles se tomó 1 mL de cada muestra y se depositó en un tubo eppendorf estéril. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante que contenía el ADN bacteriano, se separó 1000 µL y se depositó en otro tubo eppendorf estéril, el cual se etiquetó y se almacenó a -20 °C hasta su utilización para la reacción de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

6.3 Identificación de *E. coli* por PCR

La identificación de *E. coli* se realizó por PCR mediante amplificación del gen 16SrRNA (Lane, 1985). *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control positivo. Para un volumen final de 20 µL por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer forward, 1 µL del primer reverse (10 pmol, Integrated DNA Technologies), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización por 30 segundos, alineación a 55 °C por un minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72 °C.

6.4 Detección del gen *floR* que codifica para resistencia a fluoroquinolonas

La detección del gen *floR* se realizó por el método de PCR convencional descrito por Doublet *et al.* (2005). Para un volumen final de 20 µL por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer forward, 1 µL del primer reverse (Tabla 2) (10 pmol, Integrated DNA Technologies), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C por 1.5 minutos. Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C.

6.5 Detección del gen *sul2* que codifica resistencia a sulfametoxazol

La detección del gen *sul2* se realizó por el método de PCR convencional descrito por Doublet *et al.* (2005). Para un volumen final de 20 µL por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer forward, 1 µL del primer reverse (Tabla 2) (10 pmol, Integrated DNA Technologies), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C por 1.5 minutos. Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C.

6.6 Detección del gen *su13* que codifica resistencia a sulfametoxazol

La detección del gen *su13* se realizó por el método de PCR convencional descrito por Perreten & Boerlin (2002). Para un volumen final de 20 µl por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 ° C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94° durante 30 segundos, 53 °C por 30 segundos, y 72 °C por 1 min. Finalmente una extensión de 72 °C por 10 minutos.

6.7 Detección del gen *int11* e *int12* (Integron clase 1 y 2)

La detección de los genes *int11* e *int12* que codifican la integrasa de los integrones clase 1 y 2, se realizó por el método de PCR convencional descrito por Ng *et al.* (1999). Para un volumen final de 20 µl por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer forward, 1 µL del primer reverse (Tabla 2) (10 pmol, Integrated DNA Technologies), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng).

La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min y 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62° C por 30 segundos y 72 °C durante 60 segundos. Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C.

6. 8 Detección de los integrones clase 1 y 2 (Región variable)

La detección de la región variable de los integrones clase 1 y 2 responsables de la captación y diseminación de genes de resistencia a través de cassettes genéticos se realizó por el método de PCR convencional descrito por Solberg *et al.* (2006). Para un volumen final de 20 µL por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer forward, 1 µL del primer reverse (Tabla 2) (10 pmol, Integrated DNA Technologies), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a

una temperatura de 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, y 72°C por 1 minuto. Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C.

6.9 Detección del gen *qacEΔ1* que codifica resistencia a desinfectantes

La detección del gen *qacEΔ1* se realizó por el método de PCR convencional descrito por Kazama en 1998. Para un volumen final de 20 µL por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer forward, 1 µL del primer reverse (Tabla 2) (10 pmol, Integrated DNA Technologies), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto. Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72 °C.

6.10 Detección del locus *MarR* y *MarO* (Múltiple resistencia a antibióticos)

La detección del locus *MarR* y *MarO* involucrados en la múltiple resistencia a antibióticos se realizó por el método de PCR convencional descrito por Park *et al.* (1998). Para un volumen final de 20 µL por mezcla de reacción se emplearon 12.5 µL de Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Amplicon), 1 µL del primer forward, 1 µL del primer reverse (Tabla 2) (10 pmol, Integrated DNA Technologies), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA template (100 ng). La amplificación del DNA se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a una temperatura de 95 ° C durante 7 min, seguido de 30 ciclos a 95 ° por 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C por 2 minutos. Finalmente una extensión de 72 °C por 5 minutos.

Tabla 2. Oligonucleótidos requeridos para la detección de genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes.

Oligonucleótido	Gen	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)	Referencia
Flor1	<i>floR</i>	CACGTTGAGCCTCTATAT	868	

Flor2		ATGCAGAAGTAGAACGCG		
Sul2-F	<i>sul2</i>	CGGCATCGTCAACATAACC	722	
Sul2-R		GTGTGCGGATGAAGTCAG		
sul3-F	<i>sul3</i>	CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTCG	990	
Sul3-R		CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGA		
Int1-F	<i>intl1</i>	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	483	
Int1-R		ACATGGGTGTAAATCATCGTC		
Int2-F	<i>intl2</i>	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	788	
Int2-R		GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		(Sáenz et al., 2004)
Int-F	Región variable	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variable	
Int-R	integrón clase 1	AAGCAGACTTGACCTGA		
Hep-F	Región variable	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	Variable	
Hep-R	integrón clase 2	GATGCCATCGCAAGTACGAG		
Qac-F	<i>qacEA1</i>	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	287	
Qac-R		TGAGCCCCATACCTACAAAGC		
MarR-R	<i>marR</i> y	AGCTAGCCTTGCATCGCA	568	
MarR-F	<i>marO</i>	TACGGCAGGACTTTCTTAAGCA		

6.11 Electroforesis y visualización

El amortiguador de pH para llevar a cabo la electroforesis de los amplicones de PCR fue Tris-borato (TBE). Se preparó una solución stock 10 X y se diluyó 1:10 con agua destilada. Posteriormente se preparó el gel agarosa al 1% por calentamiento con el amortiguador de pH. Cuando la agarosa se encontró fundida se adicionó 0.7 µL de Midori Green por cada 100 mL de agarosa. Este colorante fluorescente se intercaló en la doble hélice del DNA y permitió detectar bandas con al menos 1-10 ng de DNA al iluminar el gel con la luz ultravioleta.

Finalmente se inició la electroforesis para lo cual se conectaron los electrodos: negativo en la posición que se colocarán las muestras; positivo hacia donde migrarán las moléculas de DNA. Para visualizar los amplicones de DNA, el gel se colocó dentro de un transiluminador de luz ultravioleta (UV), el cual se encontró acoplado a un sistema de fotodocumentación que permitió analizar y fotografiar el gel.

7. RESULTADOS

7.1 Frecuencia de los genes

Para la realización de este estudio se analizaron un total de 96 cepas periodontales de *E. coli* que fueron identificadas por PCR mediante amplificación del gen 16rRNA (Figura 1). Los porcentajes de detección de los genes *floR* (figura 5), *sul2* (figura 6) y *sul3* (figura 7) se observan en la tabla 1. El porcentaje de la región variable de los integrones clase I y clase 2 se identificó en 64.5% (n=69) y 19.7% (n=19), respectivamente. Los genes *intl 1* (figura 2), *intl 2* (figura 3) y *qacEA1* (desinfectantes; figura 4) se presentaron en 34.3 % (n=33), 5.2 % (n=5) y 83.3 % (n=80), respectivamente. La presencia del Locus *marR* y *marO* se detectó en el 52.8 % (n=47) de las cepas analizadas (Tabla 2; Figura 7).

Tabla 2. Frecuencia de genes en 96 cepas de *E. coli*

Genes	No. de cepas	Porcentaje
<i>floR</i>	30	31.2
<i>sul 2</i>	44	45.8
<i>sul 3</i>	21	20.8
<i>intl 1</i>	33	34.3
<i>intl 2</i>	5	5.2
<i>qacEA1</i>	80	83.3
Región variable Integrón Clase I	69	64.5
Región variable Integrón Clase II	19	19.7
Locus <i>mar R</i> y <i>O</i>	47	52.8

El 56% (n=54) de las cepas analizadas presentó más de 4 genes de resistencia, el 39% (n=38) presentó de 1 a 3 genes y solo el 4.1% (n=4) no presentó ningún gen asociado a la resistencia de antibióticos o desinfectantes (Tabla 3).

Tabla 3. No. de genes presentes por cada cepa bacteriana

No. de genes	No. de cepas	%
0	4	4.1
1	3	3.1
2	17	17.7
3	18	18.7
4	28	29.1
5	17	17.7
6	7	7.2
7	2	2.0

7.2 Visualización de electroforesis

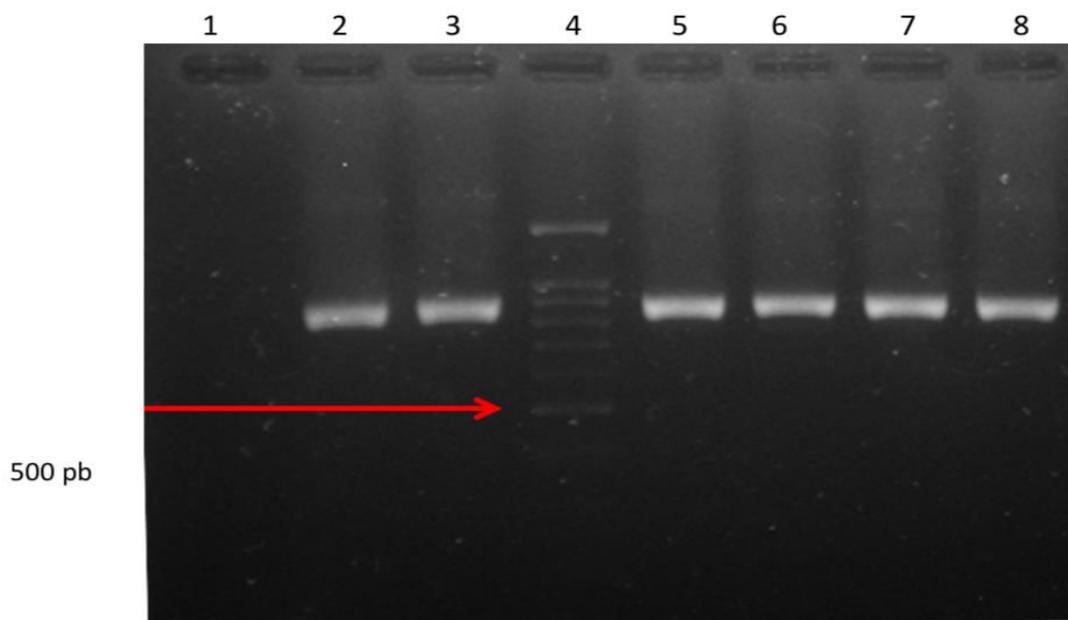


Figura 1. Detección del gen 16s *rRNA* (919 pb) por PCR. Carriles 2, 3 y 5-7: gen 16s *rRNA*, carril 4: MWM: marcador de peso molecular (100 pb); carril 8: control positivo *E. coli* ATCC 11755; carril 1: control negativo (sin DNA molde).

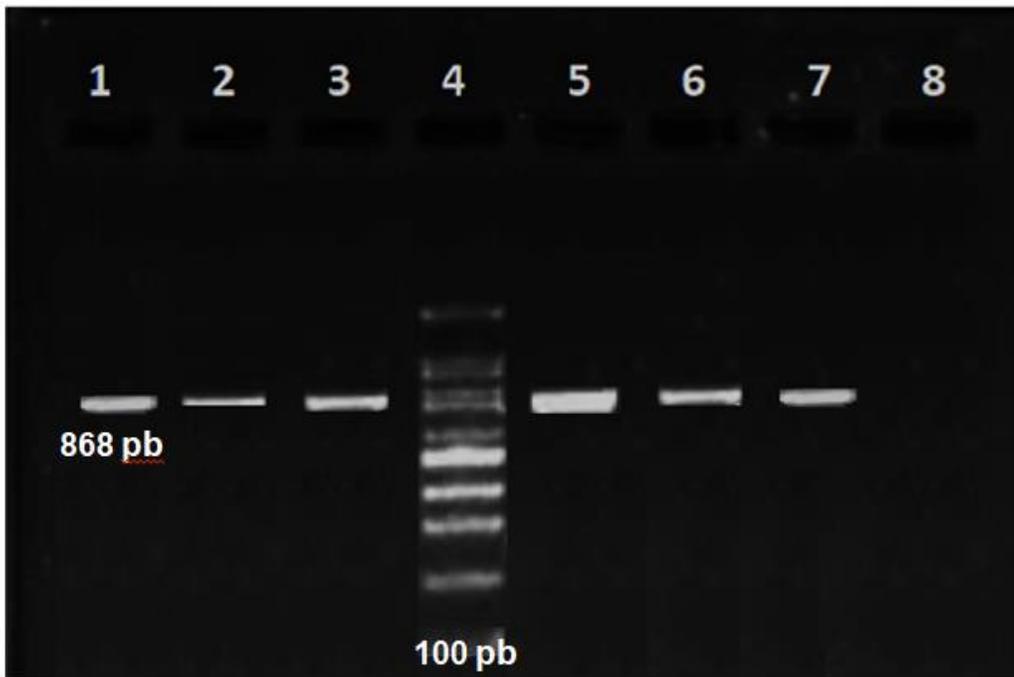


Figura 2. Detección del gen *floR* (868 pb): . Carril 1, control positivo (cepa portadora del gen); carriles: 2,-3, 5-7: cepas positivas; carril 4: marcador de tamaño molecular (MWM) de 100 pb; carril 8: control negativo (sin DNA molde).

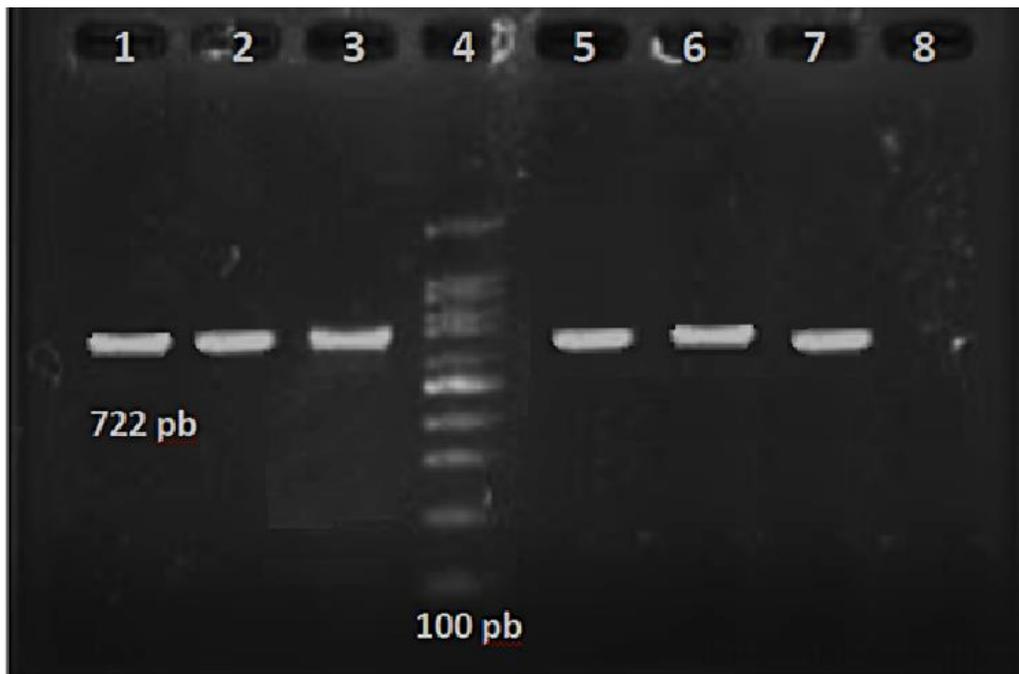


Figura 3. Detección del gen *sul 2* (722 pb.) . Carril 1, control positivo (cepa portadora del gen); carriles: 2-3, 5-7: cepas positivas; carril 4: marcador de tamaño molecular (MWM) de 100 pb; carril 8: control negativo (sin DNA molde).

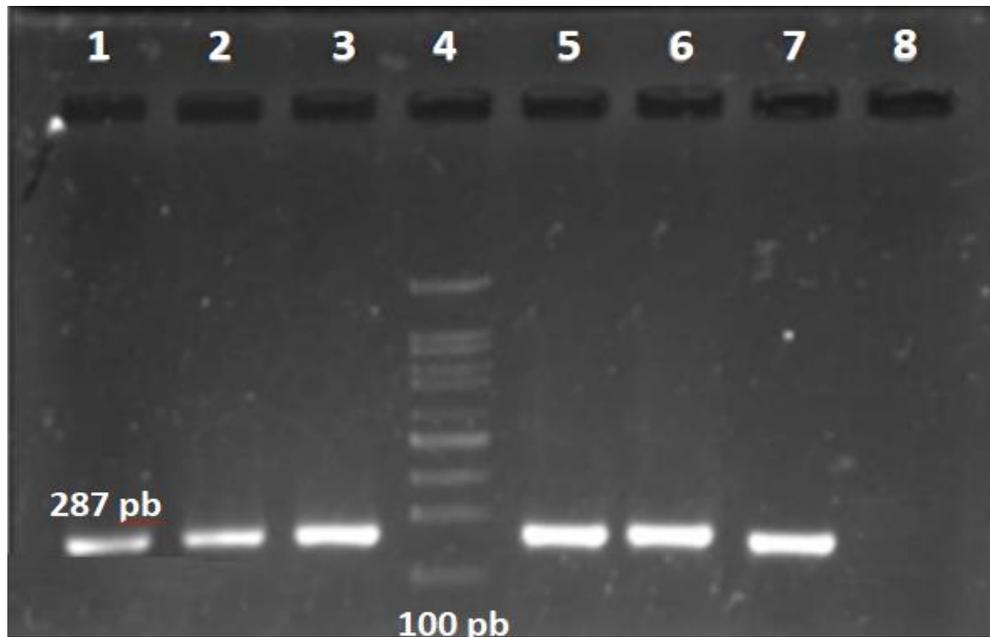


Figura 4. Detección del gen *qacEA1* (desinfectantes; 287 pb). Carril 1, control positivo (cepa portadora del gen); carriles: 2-3, 5-7: cepas positivas; carril 4: marcador de tamaño molecular (MWM) de 100 pb; carril 8: control negativo (sin DNA molde).

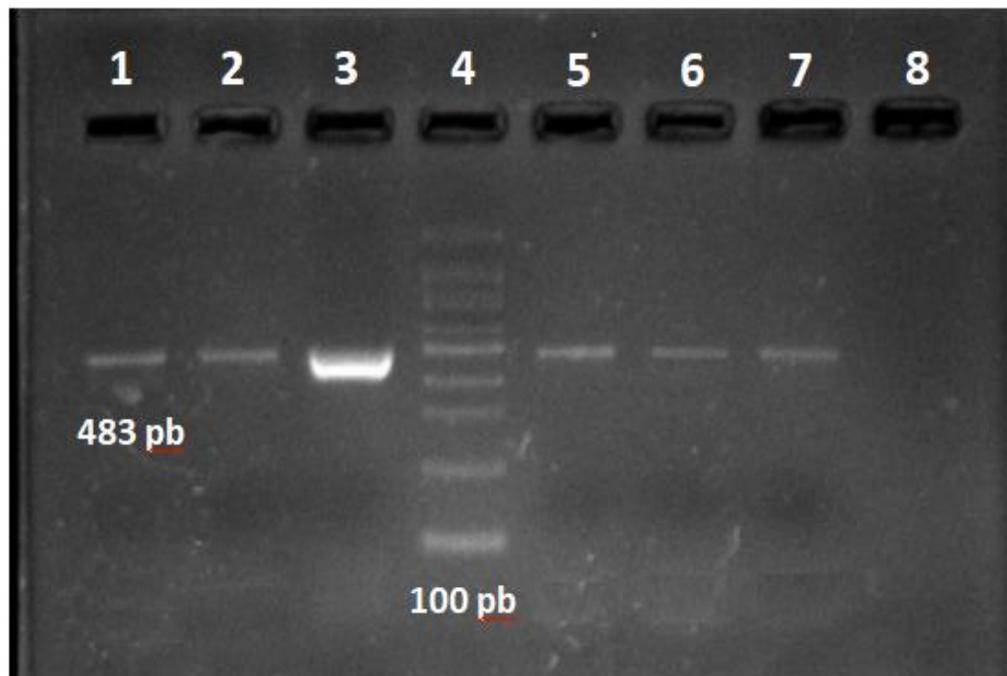


Figura 5. Detección del gen del integrón clase I (*intI1*; 483 pb). Carril 1, control positivo (cepa portadora del gen); carriles: 2-3, 5-7: cepas positivas; carril 4: marcador de tamaño molecular (MWM) de 100 pb; carril 8: control negativo (sin DNA molde).

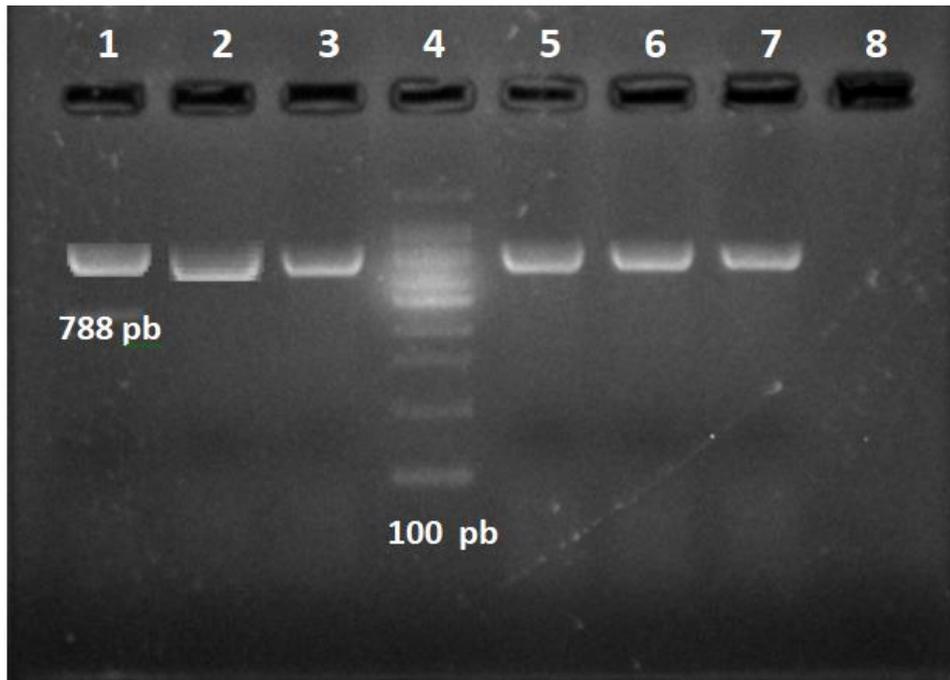


Figura 6. Detección del gen *int2* (788 pb). Carril 1, control positivo (cepa portadora del gen); carriles: 2,-3, 5- 7: cepas positivas; carril 4: marcador de tamaño molecular (MWM) de 100 pb; carril 8: control negativo (sin DNA molde).

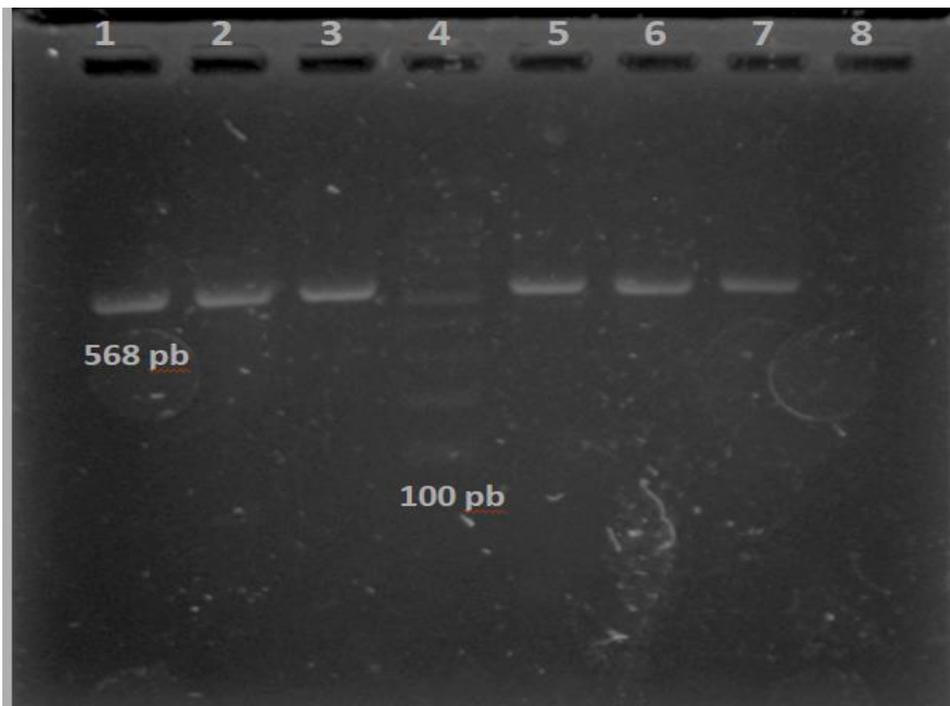


Figura 7. Detección del locus *marR* y *marO* (588 pb). Carril 1, control positivo (cepa portadora del gen); carriles: 2,-3, 5- 7: cepas positivas; carril 4: marcador de tamaño molecular (MWM) de 100 pb; carril 8: control negativo (sin DNA molde).

8. Discusión

8. 1 Infecciones periodontales

En este estudio se analizaron un total de 96 cepas provenientes de pacientes con enfermedad periodontal. La periodontitis asociada a *E. coli* ha sido descrita en países como Chile; en un estudio se reportó su presencia en 30.8 % de 27 pacientes con periodontitis, de los cuales 20 eran mujeres y 7 hombres y sus edades oscilaban entre 13 y 52 años (Silva *et al.*, 2008).

En Colombia se realizó un estudio microbiológico de 69 pacientes con periodontitis (63,8% mujeres), con un rango de edad entre 15 y 51 años con predominio de adultos entre los 30 y 39 años. En todos los pacientes se encontró prevalencia de microorganismos entéricos entre 7.2 y 17.4%, en el que *E. coli* fue la bacteria más frecuente (Botero *et al.*, 2008). En Argentina se ha descrito la presencia de enterobacterias, en donde *E. coli* es una de las más frecuentes al encontrarse en 13% de muestras, de un total de 64 pacientes con periodontitis crónica. Su presencia se asocia más frecuentemente a hombres de entre 20 y 70 años de edad (Gamboa *et al.*, 2013).

8.2 Resistencia a los antibióticos.

La resistencia bacteriana a antibióticos en cepas de *E. coli* ha sido ampliamente reportada (Rendón *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2010). En los últimos años la incidencia de la resistencia a fluoroquinolonas se ha incrementado drásticamente (Orden y De la Fuente, 2001), así como al sulfametoxazol/trimetoprim, vancomicina, entre otros antibióticos utilizados en el campo clínico (Varela *et al.*, 2005).

En un reciente estudio realizado por Kim & Lee (2015) se reportó la presencia de cepas periodontales resistentes a los antibióticos, en los que destaca la resistencia a ampicilina en un 88% y 2% a la oxaciclina, además de encontrar resistencia a fármacos como Penicilina, Ampicilina, cefepima, tetraciclina y gentamicina en el 90% de los cultivos bacterianos.

Actualmente se han identificado varios elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia de los cuales los más conocidos son los plásmidos autotransferibles o

movilizables. También se incluyen los transposones conjugativos y no conjugativos, integrones y cassettes genéticos (González *et al.*, 2004).

En este estudio se analizaron un total de 96 cepas *E. coli* aisladas de pacientes con periodontitis. Mediante PCR se determinó la frecuencia de distintos genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes, los integrones clase I y clase II, además del *locus marR* y *marO*. El 95.8% de las cepas analizadas contenían al menos uno de estos elementos genéticos.

8.3 Detección de *floR*

El gen *floR* que codifica para la resistencia a cloranfenicol fue identificado en el 31% (n=30) de las 96 cepas periodontales de *E. coli* (figura 2, tabla 2). Este resultado es semejante con lo descrito por Fuentes *et al.*, (2013) en cepas aisladas de plantas Tipo Inspección Federal, en donde estudiaron genes de resistencia y reportaron la presencia del gen *floR* en 27% de las cepas bacterianas. Por otro lado, Doublet *et al.*, (2002) reportó la presencia de este gen en 21 de 22 cepas de *E. coli* aisladas de ganado bovino de Francia y Alemania, lo que indica una frecuencia mayor con respecto a lo reportado en este estudio. Ahmed y colaboradores (2013) reportaron la presencia del gen *floR* en 17.8% (n=13) de un total de 91 cepas de *E. coli* aisladas de sangre provenientes de aves septicémicas, una cifra inferior a la que se describe en el presente estudio. Actualmente no existe mucha información de este gen en cepas clínicas de *E. coli*, por lo que no es posible hacer una comparación directa con otros estudios en los que hayan analizado su frecuencia en cepas de origen humano.

8.4 Identificación de *sul2*

El gen *sul2* que codifica para la resistencia a sulfametoxazol de las 96 cepas estudiadas fue identificado en 45 % (n=44) de las cepas (figura 3, tabla 2). Esto contrasta con lo descrito por Kern *et al.*, (2002) quien reportó la frecuencia del gen *sul2* en el 13% (n=54) de las cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes con infección urinaria. Por otra parte Gündoğdu *et al.*, (2011) reportó la presencia del gen *sul2* en 71% (n=69) de cepas uropatógenas de *E. coli* aisladas de pacientes mayores hospitalizados con infección en las vías urinarias en Queensland, Australia, cifra que es superior a lo reportado en este estudio, al igual que lo

descrito por Hammerum *et al.*, (2006), quien reporta la presencia del 80% (n=28) del gen *suI2* en cepas de *E. coli* aisladas de heces de personas sanas. Resultados similares obtuvo Yahiaoui *et al.*, 2015 en cepas uropatógenas de *Escherichia coli*, donde describe la frecuencia de este gen en 60.8%.

8.5 Identificación de *suI3*

El gen *suI3* que codifica para la resistencia a sulfametoxazol fue identificado en 21% (n=20) de las 96 cepas (tabla 2). Este resultado difiere con lo reportado por Grape *et al.*, (2003), quien identificó el gen *suI3* en 2 cepas de un total de 105 aislados urinarios clínicos. También con lo reportado por Infante *et al.*, (2005), al reportar este gen en 5% de cepas de *E. coli* aisladas de heces de niños sanos. Bean *et al.*, (2005) no encontró la presencia del gen *suI3* en 178 cepas clínicas de *Escherichia coli*. Estas diferencias podrían deberse al aumento de la resistencia en enterobacterias ya que el sulfametoxazol ha sido utilizado ampliamente durante décadas para tratar infecciones de origen humano y animal, lo que conlleva a la rápida propagación de bacterias resistentes (Sköld, 2001).

8.6 Identificación Gen *qacEA1*

El gen *qacEA1* que codifica para la resistencia a desinfectantes fue identificado en 83.3% (n=80) de las 96 cepas (figura 4, tabla 2), siendo el gen encontrado con mayor frecuencia en este estudio. Pastrana y colaboradores (2012), mostraron resultados similares al estudiar 240 cepas de origen clínico de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (EP-BLEE) colectadas durante 1990 a 2001 de hospitales de la República Mexicana, en donde encontraron este gen en 68% de cepas clínicas. Nájjar *et al.*, (2010) reportó la presencia de este gen en 91% (n=121) de un total de 153 cepas de enterobacterias en centros hospitalarios de Colombia, mostrando resultados similares con el presente estudio.

qacEA1 está distribuido ampliamente en bacterias Gramnegativas y al formar parte de la región conservada 3' de los integrones clase I, hace que su distribución sea mucho más frecuente en cepas multirresistentes que otros genes (Chuanchuen *et al.*, 2007).

8.7 Identificación integrón clase I

El integrón clase I se identificó en un total 34 % (n=33) de las 96 cepas periodontales (figura 5, tabla 2). Esto en contraste con lo reportado por Nájjar *et al.*, (2010) quien reportó la frecuencia del integrón clase I en 79.9% de un total de 153 cepas de enterobacterias aisladas de ocho hospitales de la ciudad de Bogotá de 2002 a 2005. Por otra parte, lo reportado en este estudio coincide con Vinuéa *et al.*, (2010), quien estudió un total de 135 cepas de *Escherichia coli* aisladas de hemocultivos en un hospital de España durante 2007 y observaron el gen *intl1* con una frecuencia del 38.5% (n=52). También con lo reportado por Ahangarkani *et al.*, (2017) quien reportó la frecuencia del gen *intl1* en 22% (n=22) de 100 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infección urinaria.

El integrón clase I es el más frecuente aislado de cepas clínicas y su presencia se ha asociado muy fuertemente a la multirresistencia (Kang *et al.*, 2005).

8.8 Identificación integrón clase II

El integrón clase II se identificó con una frecuencia de 5.2 % (n=5) en las 96 cepas periodontales (figura 6, tabla 2). Este resultado concuerda con el trabajo de Yu *et al.*, (2003), quien reportó la presencia de este integrón en 5% (n=29) de un total de 621 cepas de *E. coli* uropatógenas recuperadas en Korea durante un periodo de 20 años (1980 a 2000). De igual forma existe similitud con lo reportado por dos autores: Machado *et al.*, (2005) y Asgharzadeh *et al.*, (2018), quienes describen la presencia del integrón clase II en 14 % (n=19) de 133 cepas y 13% (n=25) de 193 cepas clínicas de *Escherichia coli*, respectivamente. Por otro lado, Solberg *et al.*, (2006) reporta la presencia de este integrón en 28% (n=27) de 95 cepas uropatógenas de *E. coli* analizadas, cifra superior a lo descrito en este estudio.

8.9 Región variable integrón clase I

La región variable del integrón clase I se registró en 64.7 % de las 96 cepas periodontales. La región variable del integrón clase I corresponde a los cassettes genéticos *dfrA17* , *aadA5*, *aadA1* *dfrA12* *orfF* *aadA2d*, *dfrA17* asociados a resistencia a antibióticos como trimetoprim y

aminoglucósidos (Saenz *et al.*, 2004; Nebbia *et al.*, 2008). Este resultado coincide con lo reportado por Chang *et al.*, (2017), estudio donde reporta la frecuencia del integron clase I y su región variable en cepas clínicas de *E. coli* y describe la presencia del gen *intl1* en 64% de las muestras y en la región variable la reportó 15 cassettes de genes diferentes, incluidos genes que codifican resistencia a los aminoglucósidos (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadB*, *aacA4*), cloranfenicol (*cmIA*, *catB8*), trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA17*), lincosamida (*linF*) y genes desconocidos (*orfD*, *orfF*). El tipo más común de cassette, *aadA*, acarrerado por integrones de clase 1 fueron los que confieren resistencia a la estreptomomicina y espectinomomicina, que representó el 92% (n=207) de todos los cassettes. Por otra parte el estudio llevado a cabo por Oliveira-Pinto *et al.*, 2017 contrasta con el presente trabajo al reportar en 28% (n=23) de cepas clínicas de *E. coli* la presencia de cassettes genéticos que codifican resistencia a b-lactámicos (*blaOXA-1*), aminoglucósidos (*aadA1* y *aadA5*), trimetoprim (*dfrA1* y *dfrA17*) y un *ORF* en la región variable del integrón clase I.

8.10 Región variable integrón clase II

La región variable del integrón clase II se registró en 19.5 % de las 96 cepas periodontales. Esta región corresponde al cassette genético *dfrA1-sat1-aadA1*, el cual está relacionado con la resistencia bacteriana a trimetoprim, estreptotricina y estreptomomicina, respectivamente (Su *et al.*, 2006). White *et al.*, (2001) reportó resultados diferentes al identificar el integrón clase II en 3 % (n=12) de cepas de *Escherichia coli* provenientes de aislados clínicos. Todas ellas contenían los mismos cassettes genéticos: *dfrA1*, *sat1*, y *aadA1*. Su *et al.*, (2006) reportó la presencia del gen *intl 2* en 3.6% (n=4) de cepas clínicas de *E. coli*, en las que todas presentaba los cassettes *dfrA1*, *sat1* and *aadA*. Povilonis *et al.*, (2010) describió resultados similares en cepas de origen animal y humano, en donde encontró el integrón clase II en 14% de cepas de *E. coli*. Los cassettes genéticos más frecuentes fueron *dfrA1-sat1-aadA1*.

8.11 Identificación locus *marR* y *marO*

El locus *marR* y *marO* que confiere resistencia a múltiples antibióticos se presentó en 52.8 % (n=47) del total de las 96 cepas analizadas. Saenz *et al.* (2004) estudió cambios de

aminoácidos en *marR* y las mutaciones de nucleótidos en la región del operador promotor *marO* mediante PCR en 17 cepas de *E. coli* de origen humano, animal y alimentario. Los resultados mostraron 15 cepas con sustituciones de Gly103Ser y Tyr137His en el locus *marR*, mismas que han sido encontradas en cepas clínicas resistentes. Maneewannakul *et al.*, (1996) evaluó un total de 8 cepas clínicas de *E. coli* resistentes a quinolonas en las que el 100% presentaban el locus *mar* y reportaron mutaciones en el operon *marRAB* en 3 de estas cepas, mismas que se relacionan con el aumento en la expresión de la principal bomba de flujo AcrAB-TolC de múltiples fármacos (Warner *et al.*, 2013).

9. Conclusiones

- En este estudio se demostró que las cepas de *E. coli* periodontales fueron portadoras de genes de resistencia a quinolonas, sulfametoxazol, integrones, el locus *mar* y desinfectantes.
- El gen *qacEΔ*, 1 que confiere resistencia a desinfectantes fue encontrado con mayor frecuencia entre las cepas, seguido por *floR* (fluoroquinolonas) y *sul 2* y *sul 3* (sulfametoxazol).
- Los integrones clase 1 y clase 2, y el locus *marR* y *marO* se distribuyeron de manera homogénea entre las cepas de *E. coli*.
- La elevada distribución de los marcadores de resistencia a los antibióticos detectados en las cepas periodontales de *E. coli* representa un factor de riesgo importante para la agudeza o cronicidad de las infecciones de los pacientes.

10. REFERENCIAS

1. Abdulrahman, A., & Ghanem, A. (2018). Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1025, 41-57.
2. Abushaheen, M. A., Muzaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 1-22.
3. Ahangarkani, F., Rajabnia, R., Shahandashti, E. F., Bagheri, M. & Ramez, M. (2014). Frequency of Class 1 Integron in *Escherichia Coli* Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in North of Iran. *Materia Socio-Medica*, 27(1), 10-12.
4. Ahmed, A. M., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2013). Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 475-483.
5. Ahmed, M. O., Clegg, P. D., Williams, N. J., Baptiste, K. E., & Bennett, M. (2010). Antimicrobial resistance in equine faecal *Escherichia coli* isolates from North West England. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(1), 12-180.
6. Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (1997). Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(10), 2067–2075.
7. Alfandari, S., & Cannesson, O. (2016). Aminoglucósidos. *EMC - Tratado de Medicina*, 20(3), 1-4.
8. Alós, J.-I. (2009). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(5), 290-297.
9. Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699.

10. Ardila-Medina, C. M. (2010). Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 22(1), 27-35.
11. Asgharzadeh, K. S., & Mojtahedi, A. (2018). Evaluation of integrons classes 1–3 in extended spectrum beta-lactamases and multi drug resistant *Escherichia coli* isolates in the North of Iran. *Gene Reports*, 12, 299-303.
12. Bean, D. C., Livermore, D. M., Papa, I., & Hall, L. M. C. (2005). Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(5), 962-964.
13. Botero, A., Alvear, F. S., Vélez, M. E., Botero, L., & Velásquez, H. (2008). Evaluación de los enfoques terapéuticos para las varias formas de enfermedad periodontal. parte iii: prevalencia de bacilos entéricos y levaduras. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*, 20(1), 72-86.
14. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52.
15. Caro, N, M. R., Hernando, R. S., Carrero, P., & García, S. (2007). Estudio de multiresistencia antibiótica de *Escherichia coli* en urocultivos. *Medicina Clínica*, 129(11), 409-411.
16. Chang, L.-L., Chang, T.-M., & Chang, C.-Y. (2007). Variable Gene Cassette Patterns of Class 1 Integron-Associated Drug-Resistant *Escherichia Coli* in Taiwan. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 23(6), 273-280.
17. Céspedes, A.P., Manrique, I.Y., Silva, E. M., Reza, M. T., & Anaya, J. R. (2010). Prevalencia de integrones clase 1 en enterobacterias de centros hospitalarios de Bogotá, Colombia. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 30 (2): 42-48.
18. Chuanchuen, R., Khemtong, S., & Padungtod, P. (2007). Occurrence of *qace/qaceΔ1* genes and their correlation with class 1 integrons in salmonella enterica isolates from poultry and swine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 38(5), 855-862.

19. Cobos-Trigueros, N., Ateka, O., Pitart, C., & Vila, J. (2009). Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(7), 412-418.
20. Cruz-Olivo, E. A., Ramirez Escobar, J. H., & Contreras Rengifo, A. (2014). La moxifloxacina como coadyuvante en el tratamiento de las periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 7(3), 200-208.
21. Di-Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1), 63-78.
22. Di-Conza, J. A., Power, P., & Gutkind, G. O. (2013). Intercambio de mecanismos de resistencia entre bacterias gram negativas. *Revista Farmacéutica Reviews*, 155(1), 57-69.
23. Doublet, B. (2002). Molecular analysis of chromosomally florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from France and Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), 49-54.
24. Doublet, B., Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Cloeckaert, A. (2005). Florfenicol Resistance Gene floR Is Part of a Novel Transposon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2106-2108.
25. Faleiro, P. L. (2010). formación de biopelículas por "*Escherichia coli*" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia, Madrid.
26. Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402-409.
27. Fuentes, A. R., Talavera, R. M., Vázquez, N. J., Soriano, V. E., & Gutiérrez, C. A. (2013) Presence of class I integrons in *Escherichia coli* isolated from meat products in Federal Inspection Type (TIF) plants in the Estado de México. *Veterinaria México*, 44(1), 23-30.
28. Fullana, N. (2014). Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, Uruguay.

29. Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., & Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*, 27(1), 22-29.
30. Gamboa, F. D., A. García, A. Acosta, D. Mizrahi, A. Paz, D. Martínez, A. Arévalo, F. Aristizabal, M. Abba. (2013). Presence and antimicrobial profile of gram-negative facultative anaerobe rods in patients with chronic periodontitis and gingivitis. *Acta Odontológica Americana*, 26(1), 24-30.
31. Garrido, M. E. (2006). Caracterización de los sistemas de captación de Hierro y Zinc del patógeno animal *Pasteurella multocida*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
32. González, R. G., Mella, M. S., Zemelman, Z. R., Bello, T. H., & Domínguez, Y. M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista médica de Chile*, 132(5), 619-626.
33. Grape, M. (2003). Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), 1022-1024.
34. Guillén, L., Millán, B., & Araque, M. (2014). Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*, 18(3), 100-108.
35. Guiral, E., Gonçalves Quiles, M., Muñoz, L., Moreno-Morales, J., Alejo-Cancho, I., Salvador, P., Alvarez-Martinez, M. J., Marco, F., & Vila, J. (2018). Emergence of Resistance to Quinolones and β -Lactam Antibiotics in Enteroaggregative and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causing Traveler's Diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), 1-28.
36. Gündoğdu, A., Long, Y. B., Vollmerhausen, T. L., & Katouli, M. (2011). Antimicrobial resistance and distribution of *sul* genes and integron-associated *intl* genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. *Journal of Medical Microbiology*, 60(11), 1633-1642.

37. Gunther, N. W., Lockett, V., Johnson, D. E., & Mobley, H. L. T. (2001). *In Vivo* Dynamics of Type 1 Fimbria Regulation in Uropathogenic *Escherichia coli* during Experimental Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity*, 69(5), 2838-2846.
38. Gutiérrez, D., Pérez, P., Ruiz, E., & Ríos, I. (2014). Formas clínicas de infecciones por enterobacterias. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(55), 3283-3290.
39. Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15(4), 593-600.
40. Handal, T., Caugant, D. A., & Olsen, I. (2003). Antibiotic Resistance in Bacteria Isolated from Subgingival Plaque in a Norwegian Population with Refractory Marginal Periodontitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1443-1446.
41. Hao, Y., Chen, S., Chang, H., Yan, X., Zhou, W., Cao, X., Huang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Jia, B., Wu, W., Xiong, Y., Chen, Y., & Wu, C. (2020). Temporal association between carbapenems usage and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria at a tertiary hospital in Nanjing, China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(2), 115083.
42. Hao, Z., Lou, H., Zhu, R., Zhu, J., Zhang, D., Zhao, B. S., Zeng, S., Chen, X., Chan, J., He, C., & Chen, P. R. (2013). The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 10(1), 21-28.
43. Phuong-Hoa, P. T., Nonaka, L., Hung Viet, P., & Suzuki, S. (2008). Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Science of The Total Environment*, 405(1-3), 377-384.
44. Hammerum, A. M., Sandvang, D., Andersen, S. R., Seyfarth, A. M., Porsbo, L. J., Frimodt-Møller, N., & Heuer, O. E. (2006). Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 235-237.
45. Hassoun-Kheir, N., Stabholz, Y., Kreft, J.-U., de la Cruz, R., Romalde, J. L., Nesme, J., Sørensen, S. J., Smets, B. F., Graham, D., & Paul, M. (2020). Comparison of antibiotic-resistant

bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 743, 140804.

46. Helmi, M. F., Huang, H., Goodson, J. M., Hasturk, H., Tavares, M., & Natto, Z. S. (2019). Prevalence of periodontitis and alveolar bone loss in a patient population at Harvard School of Dental Medicine. *BMC Oral Health*, 19(1), 1-11.

47. Henard, S., & Rabaud, C. (2012). Glucopéptidos. *EMC - Tratado de Medicina*, 16(2), 1-5.

48. Huapaya, B., Huguet, J., Suárez, V., Torres de Yón., Montoya, Y., Salazar, E., Sakuray, S., Tejada, C., Gambirazio, C., & Gómez, J. (2001). Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 Enterohemorrágica en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 18(1-2), 38-39.

49. Infante, B., Grape, M., Larsson, M., Kristiansson, C., Pallecchi, L., Rossolini, G. M., & Kronvall, G. (2005). Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(4), 308-312.

50. Kang, H. Y., Jeong, Y. S., Oh, J. Y., Tae, S. H., Choi, C. H., Moon, D. C., Lee, W. K., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., & Lee, J. C. (2005). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(5), 639-644.

51. Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., & Arai, T. (1998). Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacE*1 in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 165(2), 295-299.

52. Kern, M. B. (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), 513-516.

53. Kim, G.-Y., & Lee, C. H. (2015). Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 45(6), 223.

54. Ko, Y., Lee, E.-M., Park, J. C., Gu, M. B., Bak, S., & Ji, S. (2020). Salivary microbiota in periodontal health and disease and their changes following nonsurgical periodontal treatment. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 50(3), 171-182.
55. Kozak, G. K., Pearl, D. L., Parkman, J., Reid-Smith, R. J., Deckert, A., & Boerlin, P. (2009). Distribution of Sulfonamide Resistance Genes in *Escherichia coli* and Salmonella Isolates from Swine and Chickens at Abattoirs in Ontario and Québec, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), 5999-6001.
56. Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
57. Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.-C., Rollán, A., Peixe, L.´., & Coque, T. M. (2005). Integron Content of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1823-1829.
58. Machuca, J., Agüero, J., Miró, E., Conejo, M. C., Oteo, J., Bou, G., González-López, J. J., Oliver, A., Navarro, F., Pascual, Á., & Martínez-Martínez, L. (2017). Prevalencia en España de mecanismos de resistencia a quinolonas en enterobacterias productoras de betalactamasas de clase C adquiridas y/o carbapenemasas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(8), 487-492.
59. Macín-Cabrera, S., Sanz-Alonso, M., Castrillón-Rivera, L., Palma-Ramos, A., Noguez-Méndez, N., Quirino-Barreda, C., & Rubio-Martínez, A. (2015). Tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes con gingivitis y periodontitis moderada. Respuesta bioquímica y microbiológica. *Revista Odontológica Mexicana*, 19(3), 155-164.
60. Maneewannakul, K., & Levy, S. B. (1996). Identification for mar mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(7), 1695-1698.
61. Martínez, A., (2011). Aislamiento de especies de Prevotella y Enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. (Tesis de licenciatura) PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, Bogotá.

62. Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 4-9.
63. Merino, I., (2018). *Resistencia, virulencia y estructura poblacional de Escherichia coli Uropatógeno* (tesis doctoral). Universidad Complutense De Madrid, Madrid.
64. Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(7), 426-433.
65. Morales, Y. E., Herrera, M. C., & Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(1), 58-69.
66. Moreno, L., (2012). búsqueda de enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica: aislamiento e identificación (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
67. Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2014). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648-656.
68. Nájjar, A.P., Pulido, I. Y., Valenzuela, E. M., Reguero, M. T., & Mantilla, J. R. (2010). Prevalencia de integrones clase 1 en enterobacterias de centros hospitalarios de Bogotá, Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 30(2), 42-48.
69. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.
70. Nebbia, P., Tramuta, C., Giammarino, M., Ambrogi, C., Salvarani, S., Marotta, A., & Robino, P. (2008). Antimicrobial resistance, class 1 and 2 integrons and gene cassettes in avian *Escherichia coli*. *Italian Journal of Animal Science*, 7(3), 391-395.
71. Ng, L.-K., Mulvey, M. R., Martin, I., Peters, G. A., & Johnson, W. (1999). Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance in Canadian Isolates of Salmonella Serovar Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 3018-3021.

72. Nicoloff, H., Perreten, V., McMurry, L. M., & Levy, S. B. (2006). Role for Tandem Duplication and Lon Protease in AcrAB-TolC- Dependent Multiple Antibiotic Resistance (Mar) in an *Escherichia coli* Mutant without Mutations in marRAB or acrRAB. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4413-4423.
73. Oliveira-Pinto, C., Diamantino, C., Oliveira, P. L., Reis, M. P., Costa, P. S., Paiva, M. C., Nardi, R. M. D., Magalhães, P. P., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2017). Occurrence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* from healthy individuals and those with urinary infection. *Journal of Medical Microbiology*, 66(5), 577-583.
74. Orden, Gutiérrez, J. A., & Fuente López, R. . d. e. . l. a. (2001). Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista Española de Salud Pública*, 75(4), 313-320.
75. Park, Y.-H., Yoo, J.-H., Huh, D.-H., Cho, Y.-K., Choi, J.-H., & Shin, W.-S. (1998). Molecular analysis of fluoroquinolone-resistance in *Escherichia coli* on the aspect of gyrase and multiple antibiotic resistance (*mar*) genes. *Yonsei Medical Journal*, 39(6), 534.
76. Pastrana-Carrasco, J., Garza-Ramos, J. U., Barrios, H., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Barajas, J. M., Suarez, S., Diaz, R., Miranda, G., Solórzano, F., Contreras, J., & Silva-Sánchez, J. (2012). Frecuencia del gen *qacEΔ1* y resistencia a biocidas en aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido. *Revista de Investigación Clínica*, 64(6), 535-540.
77. Pérez, P., Galán, F., Gutiérrez, D., & Guerrero, L. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine*, 11(55), 3276-3282.
78. Perreten, V., & Boerlin, P. (2003). A New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1169-1172.
79. Plaza, M. L., & Soto, A. A. (2014). Prevalencia de periodontitis crónica en pacientes con enfermedades sistémicas. *Revista Mexicana De Periodontología*, 5(2), 51-55.
80. Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20-51.

81. Povilonis, J., Šeputienė, V., Ružauskas, M., Šiugždinienė, R., Virgailis, M., Pavilonis, A., & Sužiedėlienė, E. (2010). Transferable Class 1 and 2 Integrons in *Escherichia coli* and *Salmonella* enterical isolates of Human and Animal Origin in Lithuania. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(10), 1185-1192.
82. Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3426-3431.
83. Ramírez, J. C. M., Lopera, N. S., López, A. P., Agudelo-Suárez, A. A., & Botero, J. E. (2017). Periodontal disease and its relationship with clinical and sociodemographic variables in adult patients treated in a service/teaching institution. *Revista Odontológica Mexicana*, 21(3), 160-167.
84. Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151-171.
85. Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438-445.
86. Redondo, C., & Alonso, G. (2007). Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2), 575-584.
87. Rendón, M., Reyes, A., Rosas, B., & Rodríguez, W. (2012). Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. coli* y *E. coli* ESBL a quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y nitrofurantoína. *Medicina Interna de México*, 28(5), 434-439.
88. Risco, E., Miguélez, C., Sánchez de Badajoz, E., & Rouseaud, A. (2010). Efecto del arandano americano (Cysticlean®), sobre la adherencia de *Escherichia coli* a células epiteliales de vejiga: Estudio in vitro y ex vivo. *Archivos Españoles de Urología* (Ed. impresa), 63(6), 422-430.
89. Rivera, A., Larrosa, N., Mirelis, B., & Navarro, F. (2014). Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 30-36.

90. Rivero, M., Paola, N., Etcheverria, A., & Parma, A. (2004) *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome uremico hemolítico en Argentina. *Medicina Buenos Aires*. 64(4), 352-356.
91. Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E. H., Contreras, C., Rivera, F. P., Mosquito, S., Lluque, Á., & Ochoa, T. J. (2011). Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* Difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 21-28.
92. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5), 464-465.
93. Rojo, N. R., Flores, A., & Arcos, C. (2011). Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. *Revista Odontológica Mexicana*, 15(1), 31-39.
94. Ruiz-Blázquez, J., Vargas, M., Nataro, J. P., Vila, J., & Gascón i Brustenga, J. (2005). Validación de la técnica de PCR para la detección de *Escherichia coli* enteroagregativa causante de diarrea del viajero. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(8), 479-481.
95. Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996-4001.
96. Sánchez-B. P., Muñoz-M. R., Gutiérrez-M. N. P. (2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Spei Domus*, 8(17), 31-37.
97. Silva, N. Gajardo, M. Quintero, A. (2008) Bacilos Gram Negativos No Fastidiosos en la Microbiota Subgingival y Lingual en un Grupo de Pacientes Chilenos con Periodontitis. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 1(1), 5-8.
98. Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 32(3/4), 261-273.

99. Slots, J., Feik, D., & Rams, T. E. (1990). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 5(3), 149-154.
100. Solberg, O. D., Ajiboye, R. M., & Riley, L. W. (2006). Origin of Class 1 and 2 Integrons and Gene Cassettes in a Population-Based Sample of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1347-1351.
101. Soto, S. M. (2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(8), 479-480.
102. Su, J., Shi, L., Yang, L., Xiao, Z., Li, X., & Yamasaki, S. (2006). Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 75-80.
103. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129.
104. Taborda, R. L. M., Silva, L. A., Orlandi, P. P., Batista, F. S., Rodrigues, R. S., & Matos, N. B. (2018). Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* among diarrheal children in western brazilian amazon. *Arquivos de Gastroenterologia*, 55(4), 390-396.
105. Umpiérrez, A., Ernst, D., Fernández, M., Oliver, M., Casaux, M. L., Caffarena, R. D., Schild, C., Giannitti, F., Fraga, M., & Zunino, P. (2020). Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Revista Argentina de Microbiología*, 1-5.
106. Varela, E., Contreras, R., & Alvarez, A. (2005). Resistencia microbiana en la red nacional cubana de laboratorios con equipos DIRAMIC durante los años 2002 al 2004. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 36(1), 1-8.
107. Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), 122-130.
108. Vidal, J., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376-386.

109. Vinué, L., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Olarte, I., Undabeitia, E., Somalo, S., Zarazaga, M., & Torres, C. (2010). Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(5), 492-496.
110. Vives-Soto, M., & Difabio, M. (2010). Tratamiento de las infecciones por enterobacterias. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3432-3439.
111. Warner, D. M., Yang, Q., Duval, V., Chen, M., Xu, Y., & Levy, S. B. (2013). Involvement of MarR and YedS in Carbapenem Resistance in a Clinical Isolate of *Escherichia coli* from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4), 1935-1937.
112. White, P. A., Mclver, C. J., & Rawlinson, W. D. (2001). Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2658-2661.
113. Yang, Q. E., Walsh, T. R., Liu, B. T., Zou, M. T., Deng, H., Fang, L. X., Liao, X. P., Sun, J., & Liu, Y. H. (2016). Complete Sequence of the FII Plasmid p42-2, Carrying blaCTX-M-55, oqxAB, fosA3, and floR from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4336-4338.
114. Yahiaoui, M., Robin, F., Bakour, R., Hamidi, M., Bonnet, R., & Messai, Y. (2015). Antibiotic Resistance, Virulence, and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 21(5), 516-526.
115. Yu, H. S., Lee, J. C., Kang, H. Y., Ro, D. W., Chung, J. Y., Jeong, Y. S., Tae, S. H., Choi, C. H., Lee, E. Y., Seol, S. Y., Lee, Y. C., & Cho, D. T. (2003). Changes in Gene Cassettes of Class 1 Integrons among *Escherichia coli* Isolates from Urine Specimens Collected in Korea during the Last Two Decades. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5429-5433.
116. Zhu, Z., Pan, S., Wei, B., Liu, H., Zhou, Z., Huang, X., Luo, Y., Zhou, L., Zhang, S., Ma, X., Cao, S., Shen, L., Wang, Y., Fu, H., Geng, Y., He, C., Xie, Y., Peng, G., & Zhong, Z. (2020). High prevalence of multi-drug resistances and diversity of mobile genetic elements in *Escherichia coli* isolates from captive giant pandas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110681.