

## Resistencia a antibióticos en bacterias anaerobias de la microbiota intestinal de jóvenes obesos

CABRERA-GALEANA, Jonathan Daniel\*†, CISNEROS-JIMÉNEZ, Natyibe, GUZMÁN-GUZMÁN, Iris Paola, CASTRO-ALARCÓN, Natividad

*Universidad Autónoma de Guerrero*

Recibido 15 Mayo, 2015; Aceptado 30 Noviembre, 2015

### Resumen

Establecer la asociación de la frecuencia de la resistencia a antibióticos en los principales grupos de bacterias anaerobias de la microbiota intestinal con la obesidad en jóvenes residentes de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. Se incluyeron 45 jóvenes con normopeso y 37 jóvenes con obesidad. A cada participante se le tomó las medidas antropométricas, además donaron una muestra de copro para el aislamiento de las bacterias anaerobias y posteriormente realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas. Con este trabajo se demostró que las bacterias anaerobias aisladas de pacientes con obesidad tienen menor resistencia a antibióticos que las bacterias aisladas de pacientes con peso normal, en este trabajo se logró establecer una metodología sencilla para determinar la resistencia a antibióticos en bacterias anaerobias.

**Resistencia, obesidad, microbiota anaerobia, antibióticos.**

### Abstract

To establish the association between frequency of antibiotic resistance in the major groups of anaerobic bacteria of the intestinal microbiota with obesity in young residents of the city of Chilpancingo, Guerrero. 45 young people with normal weight and 37 obese young were included. Each participant took anthropometric measurements, also donated a sample of copro for isolation of anaerobic bacteria and then perform antimicrobial susceptibility testing. This work showed that the anaerobic bacteria isolated from patients with obesity have less resistance to antibiotics than bacteria isolated from patients with normal weight, this study was possible to establish a simple methodology for determining antibiotic resistance in anaerobic bacteria.

**Resistance, obesity, intestinal microbiota, antibiotics.**

**Citación:** CABRERA-GALEANA, Jonathan Daniel, CISNEROS-JIMÉNEZ, Natyibe, GUZMÁN-GUZMÁN, Iris Paola y CASTRO-ALARCÓN, Natividad. Resistencia a antibióticos en bacterias anaerobias de la microbiota intestinal de jóvenes obesos. *Revista de Ciencias de la Salud* 2015, 2-5: 109-113

\*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: joner\_oner@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor

## Introducción

La microbiota intestinal (MI) representa un diverso ecosistema microbiano, la mayoría de estas bacterias se desarrollan en condiciones anaerobias y son consideradas benéficas para la salud del hombre. Esta composición puede verse modificada por varios factores en los que se incluye el uso indiscriminado de antibióticos, siendo este el que favorece el desarrollo de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos. En los últimos años se ha relacionado a la MI como un factor implicado en la regulación del peso corporal, dada su influencia en las funciones metabólicas. Sabiendo que hay factores que pueden alterar la composición y funciones de la MI es importante determinar las diferencias en la resistencia a antibióticos en bacterias anaerobias de la MI, para conocer la influencia de los antibióticos en los grupos bacterianos y su posible asociación con la obesidad (Blaut & Klaus, 2012; Cortez 2014). Un estudio de este tipo es importante y útil para conocer la resistencia a antibióticos de mayor uso frente a los géneros bacterianos más comunes aislados de la microbiota intestinal, puesto que la población se ve expuesta a consumir dichos fármacos indiscriminadamente y por lo tanto desarrollan cepas resistentes.

## Objetivo

Establecer la asociación de la frecuencia de la resistencia a antibióticos en los principales grupos de bacterias anaerobias de la microbiota intestinal con la obesidad en jóvenes residentes de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero.

## Metodología

### Selección de la población de estudio

Se llevó a cabo un estudio de casos y controles, en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. Dicho estudio incluyó a jóvenes de entre 18 a 25 años de edad.

Los controles fueron jóvenes con un índice de Masa Corporal (IMC) de 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup> mientras que los casos debían tener un IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>. Se excluyeron a las personas que se encontraban bajo tratamiento con antibióticos o algún desparasitante, alguna dieta para bajar de peso, mujeres embarazadas y personas con bajo peso y sobrepeso. Se eligieron a las personas que cumplieran con los criterios de inclusión para cada grupo de estudio. A cada participante se le aplicó una encuesta que incluían: datos personales (nombre, edad, sexo, lugar de nacimiento, domicilio, teléfono, entre otros), datos clínicos, actividad física y hábitos alimenticios. Además de las medidas antropométricas para la determinación de su IMC según la clasificación que propone la OMS.

## Recolección y procesamiento de la muestra

Cada participante recolectó la muestra de copro en un frasco estéril, se les pidió que tomaran su muestra por la mañana y la llevaran inmediatamente al laboratorio. La muestra fecal recolectada fue procesada con una serie de diluciones en condiciones estériles y posteriormente se inoculó en los medios de cultivo correspondientes (Agar Bacteroides bilis esculina, Agar Lactobacillus, Agar base Columbia y Agar Clostridium) (Kocelaket al, 2013). Posteriormente las placas fueron incubadas a 35°C durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis con un sistema gaspak. Se realizó también la prueba de aerotolerancia en agar Columbia. Estas placas se incubaron en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (gaspak) durante 24 horas a 35°C. Pasado este tiempo se procedió a la lectura de las placas con la finalidad de descartar a las bacterias aerobias y trabajar solamente con las anaerobias estrictas.

## Identificación bacteriana

Para la identificación de los géneros anaerobios se tomó en cuenta la morfología colonial, tinción de gram, prueba de catalasa, hidrólisis de bilis esculina, producción de indol y movilidad.

## Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

La resistencia antimicrobiana se evaluó mediante el método de elución en caldo con discos (Legariaet al, 2011). El inóculo se preparó mediante una suspensión bacteriana en solución salina fisiológica para compararla con 5 ml del estándar 0.5 de la escala de Mac Farland y después se inóculó en caldo de cultivo infusión cerebro corazón suplementado con vitamina K1 1 µg/ml y extracto de levadura 50 mg/ml.

Se utilizaron tubos controles: un control del desarrollo, el cual contenía el inóculo sin antibiótico y un control de esterilidad del medio, que contenía sólo con caldo. En los tubos para las pruebas se inocularon 100 µl de la suspensión bacteriana y se agregaron discos de antibióticos (Ampicilina [10 µg], Ampicilina Sulbactam [10/10 µg], Penicilina [10U], Cefoxitina [30 µg] y Clindamicina [2 µg]). Posteriormente se realizó la incubación en condiciones de anaerobiosis con un sistema gaspak, a 35 °C durante 48 h.

## Detección de betalactamasas

Para la detección de las betalactamasas se utilizó la prueba de cefalosporina cromogénica. En esta prueba se emplearon discos de papel filtro impregnados con nitrocefina, se realizó un frotis sobre el disco con un inóculo denso de la cepa aislada y se colocó sobre una caja Petri cerrada para evitar la rápida desecación. Los microorganismos que presentaban betalactamasas cambiaban el color del disco a un tono rojizo, mientras que los microorganismos ausentes de dichas enzimas mantenían un color amarillo.

## Prueba D-test

Esta prueba se realizó en agar Columbia suplementado con 5% de sangre, se preparó un inóculo bacteriano de turbidez similar al patrón 0,5 de Mac Farland.

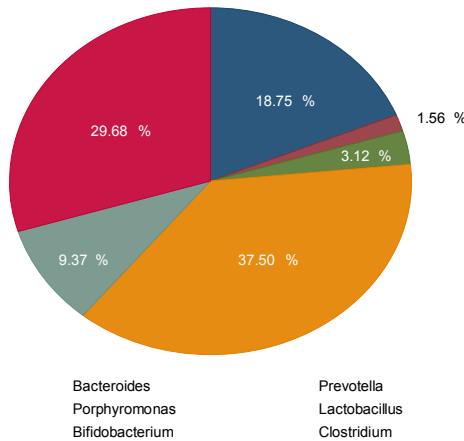
Posteriormente, con un hisopo estéril se inóculo en la placa, una vez seco el inóculo se colocaron los discos de Eritromicina (15 µg) y de Clindamicina (2 µg) a una distancia de 10 a 15 mm de centro a centro. Cada cepa se incubó por 48 horas a 35°C en condiciones anaeróbicas con un sistema gaspak.

## Resultados

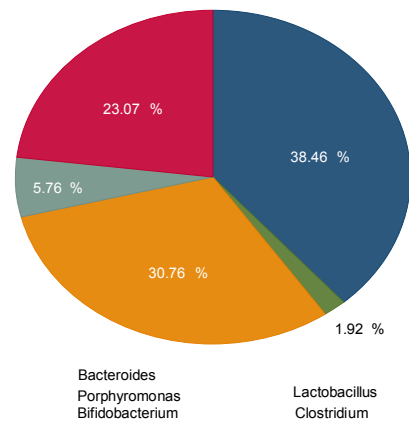
En el presente estudio participaron 83 jóvenes, de los cuales, 46 corresponden al grupo de normopeso con una mediana de 22.01 kg/m<sup>2</sup> y 37 al grupo de obesidad con una mediana de 32.62 kg/m<sup>2</sup>. La edad promedio de los participantes fue de 21 años, notándose que no existe homogeneidad de género de acuerdo con el IMC. Se encontraron valores significativos (p<0.050) en las características de peso, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera y el índice de cintura cadera (ICC) al comparar ambos grupos de estudio, notando que los jóvenes con obesidad presentaron valores mayores en las medidas descritas (tabla 1). A partir de la materia fecal se aislaron un total de 116 bacterias anaerobias, donde la mayor parte de cepas fueron de los jóvenes con normopeso con 64 cepas (55%) y 52 cepas (45%) de los jóvenes obesos (grafica 1 y 2).

Características	Jóvenes con normopeso (n=46)	Jóvenes con obesidad (n=37)	Valor de p
Edad (años) <sup>a</sup>	21.5 ±1.7	21.02 ±1.6	0.215
Género n(%) <sup>a</sup>			
Femenino	29 (60.42)	19 (39.58)	0.284
Masculino	17 (48.57)	18 (51.43)	
Peso (kg) <sup>b</sup>	56.2 (53.1-63)	91.5 (76-101.3)	<0.001*
Talla (m) <sup>a</sup>	1.60 ±0.09	1.63 ±0.10	0.224
Circunferencia cintura (cm) <sup>b</sup>			
Femenino	75 (71-77)	92 (87-102)	<0.001*
Masculino	78 (72-81)	108.5 (104-113)	<0.001*
Circunferencia Cadera (cm) <sup>b</sup>	94 (91-99)	113 (109-119)	<0.001*
ICC (cm) <sup>b</sup>			
Femenino	0.78 (0.76-0.81)	0.84 (0.80-0.90)	<0.001*
Masculino	0.81 (0.78-0.84)	0.93 (0.89-0.98)	<0.001*

**Tabla 1** Características antropométricas de los grupos de estudio.



**Gráfica 1** Frecuencia de microorganismos aislados a partir de materia fecal de jóvenes con normopeso.



**Gráfica 2** Frecuencia de microorganismos aislados a partir de materia fecal de jóvenes con obesidad.

Los resultados que se obtuvieron en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por grupo bacteriano se muestran en la tabla 2.

El antibiótico con mayor frecuencia de resistencia fue Penicilina (97 cepas resistentes). En el grupo de normopeso se obtuvo una frecuencia de 49 cepas resistentes para Ampicilina, en cambio en el grupo de obesidad la frecuencia de resistencia para el mismo antibiótico fue de 44.

En el caso de Ampicilina con Sulbactam se obtuvo mayor frecuencia en la sensibilidad en ambos grupos, con un total de 50 para el grupo de normopeso y 42 para el de obesos.

En los resultados obtenidos para Cefoxitina prevalece la resistencia bacteriana en los jóvenes con normopeso y en los obesos la sensibilidad.

En Clindamicina es notoria la alta frecuencia de resistencia respecto a las bacterias que resultaron sensibles a este antibiótico.

Microorganismos	Prueba de elución en caldo con discos				Valor de p*
	Normopesos (n=64)		Obesos (n=52)		
	Ampicilina				
	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	
Bacteroides	9 (75)	3 (25)	18 (90)	2 (10)	0.338
Prevotella	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
Porphyromonas	0 (0)	2 (100)	0 (0)	1 (100)	-
Lactobacillus	18 (75)	6 (25)	16 (100)	0 (0)	0.064
Bifidobacterium	5 (83.33)	1 (16.67)	2 (66.67)	1 (33.33)	1.000
Clostridium	16 (84.21)	3 (15.79)	8 (66.67)	4 (33.33)	0.384
	Ampicilina con sulbactam				
Bacteroides	2 (16.67)	10 (83.33)	1 (5)	19 (95)	0.540
Prevotella	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	-
Porphyromonas	0 (0)	2 (100)	0 (0)	1 (100)	-
Lactobacillus	5 (20.83)	19 (79.17)	5 (31.25)	11 (68.75)	0.456**
Bifidobacterium	2 (33.33)	4 (66.67)	1 (33.33)	2 (66.67)	1.000
Clostridium	5 (26.32)	14 (73.68)	3 (25)	9 (75)	1.000
	Penicilina				
Bacteroides	10 (83.33)	2 (16.67)	15 (75)	5 (25)	0.683
Prevotella	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
Porphyromonas	1 (50)	1 (50)	1 (100)	0 (0)	1.000
Lactobacillus	21 (87.50)	3 (12.50)	15 (93.75)	1 (6.25)	0.638
Bifidobacterium	6 (100)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	-
Clostridium	16 (84.21)	3 (15.79)	8 (66.67)	4 (33.33)	0.384
	Cefoxitina				
Bacteroides	4 (33.33)	8 (66.67)	8 (40)	12 (60)	1.000
Prevotella	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	-
Porphyromonas	1 (50)	1 (50)	1 (100)	0 (0)	1.000
Lactobacillus	17 (70.83)	7 (29.17)	7 (43.75)	9 (56.25)	0.057**
Bifidobacterium	3 (50)	3 (50)	2 (66.67)	1 (33.33)	1.000
Clostridium	14 (73.68)	5 (26.32)	7 (58.33)	5 (41.67)	0.447
	Clindamicina				
Bacteroides	6 (50)	6 (50)	10 (50)	10 (50)	1.000**
Prevotella	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-
Porphyromonas	1 (50)	1 (50)	0 (0)	1 (100)	1.000
Lactobacillus	21 (87.50)	3 (12.50)	9 (56.25)	7 (43.75)	0.052
Bifidobacterium	6 (100)	0 (0)	1 (33.33)	2 (66.67)	0.250
Clostridium	15 (78.95)	4 (21.05)	7 (58.33)	5 (41.67)	0.253

**Tabla 2** Frecuencias y porcentajes de la sensibilidad y la resistencia de microorganismos anaerobios a los antibióticos.

En la prueba de detección de betalactamasas se observa que Lactobacillus y Bacteroides son las cepas con mayor número de producción de betalactamasas en el grupo con normopeso y obesidad respectivamente.

Clostridium es la tercera bacteria con mayor producción de betalactamasas (tabla 3).

Microorganismo	Prueba de nitrocefina cromogénica				Valor de P*
	Normopesos (n=64)		Obesos (n=52)		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Bacteroides	7 (58.33)	5 (41.67)	17 (85)	3 (15)	0.116
Prevotella	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	-
Porphyromonas	1 (50)	1 (50)	0 (0)	1 (100)	1.000
Lactobacillus	11 (45.83)	13 (54.17)	5 (31.25)	11 (68.75)	0.356*
Bifidobacterium	3 (50)	3 (50)	1 (33.33)	2 (66.67)	1.000
Clostridium	5 (26.32)	14 (73.68)	3 (25)	9 (75)	1.000

**Tabla 3** Frecuencias y porcentajes de la producción de betalactamasas en microorganismos anaerobios mediante la prueba de nitrocefina cromogénica.

Se realizaron 39 pruebas D-test, 14 para las personas con normopeso y 25 para las personas del grupo de obesidad, las cepas incluidas en la prueba resultaron no inducibles.

### Conclusiones

De acuerdo con los objetivos establecidos y los resultados que se obtuvieron durante la investigación podemos decir que el peso corporal de las personas no influye directamente sobre la resistencia mostrada por la bacteria, sino que solamente existe una diversificación en la cantidad y géneros bacterianos de la microbiota intestinal, los cuales tienen predominio o escasez de acuerdo a la dieta de cada individuo. Por lo que la diferencia en la frecuencia de resistencia bacteriana repercute sobre la cantidad de microorganismos aislados, sin embargo la mayoría de ellos presentan resistencia a los antibióticos de tipo betalactámicos.

### Agradecimientos

Este trabajo contó con el financiamiento de la convocatoria semilla 2014 de la UAGro.

### Referencias

Cortez, H. (2014). ¿Por qué estudiar a las bacterias anaerobias obligadas? Resumen Condiciones de crecimiento y factores de virulencia Consideraciones microbiológicas: identificación Consideraciones clínicas: tipo de infecciones frecuentes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 34(3), 105–114.

Kocelak P., Zak-Gołab A., ZahorskaMarkiewicz B., Aptekorz M., Zientara M., Martirosian G., Chudek J. & OlszaneckaGlinianowicz M. (2013). Resting energy expenditure and gut microbiota in obese and normal weight subjects. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(20), 2816–21.

Legaria M. C., Bianchini H. M., Castello L., Carloni G., Di-Martino A., Fernández L., Litterio M., Rollet R., Rossetti A. & Predari S. (2011). Primer consenso argentino para el estudio de la sensibilidad in vitro a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos. *Revista Argentina de Microbiología*, 43 (1), marzo 2011.

Blaut M. & Klaus S. (2012). Intestinal Microbiota and Obesity. *Appetite Control, Handbook of Experimental Pharmacology* 209, 251–273. Doi: 10.1007/978-3-642-24716-3