

Colonización por *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de espectro extendido en la población general

Alcázar Olaiz Martha Daniela¹, Bustamante González Alonso Jacob², García Barbosa Luz María Concepción³, López Rodríguez Elías Emmanuel⁴, Orozco Uriarte María José⁵, Rodríguez Sámano Benjamín de Jesús⁶, asesor: Álvarez Canales José Antonio de Jesús⁷, co-asesor: Alejandro Ernesto Macías Hernández⁸

^{1,2,3,4,5,6}Estudiante Lic. Médico Cirujano

md.alcazarolaiz@ugto.mx¹

aj.bustamantegonzalez@ugto.mx²

lmc.garciabarboza@ugto.mx³

ee.lopezrodriguez@ugto.mx⁴

mj.orozcouriarte@ugto.mx⁵

bdj.rodriguezsamano@ugto.mx⁶

ja.alvarez@ugto.mx⁷

ja.alvarez@ugto.mx⁸

Resumen

El objetivo del estudio fue determinar la tasa de colonización por *Escherichia coli* productora de Betalactamasa de Espectro Extendido en población general. Se diseñó un estudio de prevalencia en 41 voluntarios adultos sanos de quienes, previa firma de consentimiento informado, se les tomó espécimen bucal mediante hisopado. El hisopo se inoculó en agar MacConkey y se incubó en condiciones estándar por 24 horas. Las colonias sospechosas se evaluaron mediante pruebas bioquímicas convencionales. Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva. De los 41 especímenes, 13 (31.7%) mostraron desarrollo o crecimiento en agar MacConkey; sin embargo, ninguno fue *E. coli*. En conclusión, no se identificó presencia de *E. coli* en la cavidad oral de sujetos sanos, esto puede deberse a factores higiénicos o metodológicos.

Palabras clave: microbiota oral, enterobacterias, *Escherichia coli*, sujetos sanos.

Antecedentes

La microbiota bacteriana normal de la orofaringe previene la colonización por bacterias patógenas mediante ocupación y consumo de los nutrientes disponibles (Kazemian et al., 2017). Comprende principalmente bacterias anaerobias y estreptococos alfa-hemolíticos (*Streptococcus viridans* y *Streptococcus mitis*); sin embargo, sufre complejas variaciones entre los individuos (Sharma et al., 2018). En la figura 1 se puede observar una micrografía de espécimen bucal en donde se identifican cocos Gram-positivos y bacilos Gram-negativos. La cavidad oral actúa como un reservorio y cuando la microbiota se altera es colonizada por microorganismos patógenos que representan un riesgo potencial para el desarrollo de distintas enfermedades, donde las infecciones respiratorias son las de mayor importancia y letalidad (Kazemian et al., 2017). Las bacterias Gram-negativas representan una parte importante de estas especies patógenas (32-41%), donde las *Enterobacteriaceae* predominan (20%), seguido de bacilos Gram-negativos no fermentadores como *Pseudomonas spp* (Messika et al., 2018). La mayoría de estas bacterias son resistentes a múltiples antibióticos y se asocian con infecciones graves, principalmente en pacientes inmunosuprimidos.

La resistencia bacteriana es considerada un problema a nivel mundial. Las enterobacterias son un agente causal de infecciones nosocomiales, así como de las adquiridas en la comunidad. Se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad por sus diferentes patrones de resistencia a los antimicrobianos (Kazemian et al., 2017). *Escherichia coli* es la enterobacteria más frecuente que ha logrado generar resistencia a los antimicrobianos por la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). *E. coli* se asocia con varias infecciones extraintestinales, las cuales incluyen infecciones del tracto urinario, meningitis, neumonía, infecciones de la piel y los tejidos blandos y sepsis, que pueden progresar a casos más graves e incluso mortales si no se tiene un tratamiento antimicrobiano adecuado (Le et al, 2020). Por lo que conocer la tasa

de colonización bucal de *E. coli* productora de BLEE en la población general puede orientar medidas de prevención y tratamiento empírico.

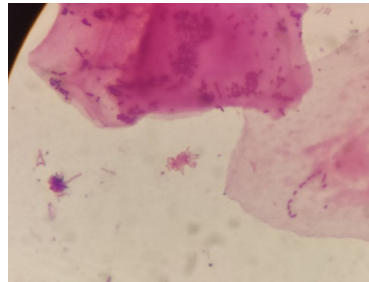


Figura 1. Micrografía electrónica de hisopado bucal donde se observa la heterogeneidad de la microbiota oral.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Estudio observacional, prospectivo, transversal y analítico.

Población del estudio

Residentes de la ciudad de León, Guanajuato sin enfermedades hemato-oncológicas.

Criterios de inclusión

Se consideraron como controles sanos a sujetos mayores de 18 años, con ausencia de neoplasias hematológicas o neoplasias sólidas malignas al momento del estudio, sin antecedentes de terapia oncológica, inmunosupresora o condiciones autoinmunes. Se eligió a los participantes en el protocolo mediante una invitación personal, donde se expusieron los objetivos, criterios de inclusión, criterios de exclusión, procedimiento, tipo de muestra y el papel que ellos fungirían en caso de decidir ser parte; aclarando que los involucrados no se beneficiarán o perjudicarán independientemente de su decisión.

Muestreo

Se obtuvieron muestras de los controles mediante hisopado bucal con hisopos estériles. Las condiciones para el muestreo fueron 8 horas de ayuno, sin aseo bucal. Los especímenes se obtuvieron de paladar blando, mucosa de carillos internos y la unión gingivo-dental durante 20 segundos. Los especímenes se colocaron directamente en medio de transporte (AMIES® COPAN®, Italia) y llevadas al laboratorio de microbiología del Departamento de Medicina y Nutrición de la Universidad de Guanajuato. Las muestras se inocularon en agar selectivo (Medio MacConkey, BD® BBL® Ciudad de México, México) y se incubaron durante 24-48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones aeróbicas. Para identificar los microorganismos aislados se realizaron procedimientos microbiológicos y bioquímicos estándar. Las pruebas bioquímicas incluyeron prueba de fermentación de carbohidratos (glucosa y lactosa), producción de sulfuro de hidrogeno y gas, prueba de movilidad, degradación de triptofano a indol, descarboxilación de aminoácidos (ornitina) y utilización de citrato.

Variables

La variable principal fue la colonización oral por *E. coli*; además, se valoró la presencia de crecimiento bacteriano en agar MacConkey. Dentro de las variables sociodemográficas se incluyeron edad, sexo, uso de enjuague bucal (con o sin clorhexidina), uso de pasta dental (con o sin triclosán), frecuencia anual de visita al odontólogo y frecuencia de cepillado al día. Dentro de las variables clínicas se evaluó la presencia de comorbilidades (diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial sistémica, enfermedad renal crónica),

toxicomanías (tabaquismo), antibioticoterapia en los últimos 15 días, enfermedad bucal (caries, aftas, gingivitis o enfermedad periodontal) y tratamiento dental (prótesis, ortodoncia o endodoncia).

Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas se reportaron medias y sus desviaciones estándar o las medianas y su rango intercuartílico (Q1 a Q3), dependiendo de la distribución de datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para las variables cualitativas la descripción se realizó mediante el reporte de proporciones, porcentajes o tasas y sus intervalos de confianza al 95%. Se determinó un tamaño de muestra mínimo de 46 voluntarios sanos, al considerar una prevalencia del 12% en la tasa de colonización en población sana. Se determinó con un valor alfa de 5% y una potencia estadística del 80%. Se utilizó la siguiente fórmula para el tamaño de la muestra:

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * (p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)) / (p_1 - p_2)^2,$$

Donde $Z_{\alpha/2}$ es el valor crítico de la distribución Normal en $\alpha/2$ (para un nivel de confianza del 95 %, α es 0.05 y el valor crítico es 1,96), Z_{β} es el valor crítico de la distribución Normal en β (para una potencia del 80%, β es 0.2 y el valor crítico es 0,84) y p_1 y p_2 son las proporciones muestrales esperadas de los dos grupos. El análisis estadístico se realizó con el software NCSS v.12.0.2,2018,LLC. Kayseville, Utah, USA.

Aspectos éticos

De acuerdo con la ley general de salud en materia para la salud en México, Capítulo 1, artículo 17 fracción II, el presente protocolo se consideró como investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplearon el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideraron: pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva; electrocardiograma, termografía, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimiento profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml. en dos meses, excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipuló la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65, entre otros.

El presente protocolo cumplió con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos propuestos en la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial, enmendada por la 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, en octubre 2013. Todos los pacientes y controles sanos participaron en el estudio al otorgar previa firma de su consentimiento informado.

Conflictos de interés

El presente estudio tuvo fines de investigación y enseñanza, no lucrativos. No recibió apoyo de algún laboratorio o fabricante de los productos que se utilizaron o analizaron en el estudio.

Resultados

Se tomaron 41 especímenes de cavidad oral mediante hisopado bucal que posteriormente se inocularon en agar MacConkey. Al respecto de las variables sociodemográficas, 22 especímenes fueron tomados en hombres (53.7%). La edad promedio de los participantes fue de 44.3 ± 18.4 años. La comorbilidad más frecuente dentro del grupo evaluado fue la Hipertensión Arterial (HTA) en 9 (22%) pacientes. Las enfermedades bucales más frecuentes fueron caries en 31 (75.6%) pacientes y gingivitis en 8 (19.5%). El número de participantes que se encontraban bajo tratamiento dental fue de 15 (36.6%) y el más común fue endodoncia, en 7 pacientes (17.1%).

De los 41 especímenes, 13 (31.7%) tuvieron crecimiento en agar MacConkey y tras la evaluación bioquímica, todas resultaron negativas para *E. coli*. Estas variables y el resto de las evaluadas en los participantes se muestran con detalle en la tabla 1.

Tabla 1. Variables evaluadas en los participantes.

Variable	n (%) media ± DE o mediana (Q1 a Q3)
Edad (años)	44.3 ± 18.4
Sexo	
Femenino	19 (46.3%)
Masculino	22 (53.7%)
Uso de antibióticos 15 días previos	4 (9.8%)
Tabaquismo	5 (12.2%)
Comorbilidades	
Hipertensión Arterial Sistémica	9 (22%)
Diabetes Mellitus	3 (7.3%)
Enfermedad Renal Crónica	2 (4.9%)
Otros	1 (2.4%)
Número de comorbilidades	
Ninguna	32 (78%)
Una	7 (17.1%)
Dos	2 (4.9%)
Frecuencia de visita odontólogo (visitas/año)	
Ninguna	6 (14.6%)
1 a 3	25 (61%)
4 a 6	5 (12.2%)
6 o más	5 (12.2%)
Última visita al odontólogo (días)	182.5 (83.6 a 364.85)
Higiene dental	
Frecuencia de cepillado (p/día)	3 (2 a 3)
Uso de hilo dental	10 (24.4%)
Uso de enjuague	24 (58.5%)
Enjuague bucal con clorhexidina	6 (14.6%)
Pasta dental con triclosán	12 (29.3%)
Enfermedad bucal	34 (82.9%)
Gingivitis	8 (19.5%)
Enfermedad periodontal	2 (4.9%)
Aftas	0
Caries	31 (75.6%)
Piezas afectadas	3 ± 4.2

Caries obturadas	2 (0 a 5)
Tratamiento Dental	14 (34.2%)
Tipo de tratamiento dental	
Ninguno	26 (63.4%)
Prótesis	3 (7.3%)
Ortodoncia	4 (9.8%)
Endodoncia	7 (17.1%)
Otros	1 (2.4%)
Aislamiento de Bacilos Gram-negativos	13 (31.7%)
Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	0



Figura 2. Placa de cultivo con agar MacConkey donde se inoculó espécimen bucal. Se observa desarrollo de colonias de microorganismos Gram-negativos de distinta morfología y metabolismo.

Discusión

En el presente trabajo se buscó la tasa de colonización por *E. coli* productora de BLEE en población sana, mediante la obtención de espécimen bucal por hisopado. La tasa de colonización por este microorganismo en la población estudiada fue 0. De los resultados obtenidos, se identificó una prevalencia de 31.7% de bacilos Gram-negativos en la cavidad oral de población sana. Estos resultados difieren de los reportados por otros estudios en la literatura y llama la atención no haber identificado a un solo portador de *E. coli* (Le et al., 2020; Nucleo et al., 2018). La razón de este hallazgo puede deberse a varios factores, uno de ellos y quizá el de mayor peso es que el número de sujetos evaluados es muy cercano al tamaño de muestra presupuestado, pero es limitado para identificar la verdadera prevalencia en la población estudiada, es decir, es probable que se haya cometido un error de tipo II. Otra razón puede estar relacionada con algunos hábitos higiénico-dietéticos y el método empleado para la identificación. Al respecto de esto último, existen en la literatura reportes donde se evalúa la presencia de *E. coli* mediante un método que contempla medios líquidos, lo cual puede incrementar la capacidad de detección, particularmente cuando este microorganismo se encuentra en escasa cantidad (Le et al., 2020; Zawadzki et al., 2017).

Debido a que el espécimen proviene de un sitio anatómico con su propia microbiota, se observó desarrollo polimicrobiano en las cajas de agar MacConkey (Figura 2). Por lo anterior, fue difícil hacer la separación física de los diferentes organismos por métodos convencionales, tales como subcultivos. Esto puede explicar que las pruebas convencionales, particularmente la prueba de citrato fuera positiva en especímenes cuyas colonias mostraban una morfología altamente sugestiva de *E. coli*.

Con base en los resultados obtenidos y la experiencia adquirida para el desarrollo de este proyecto, se considera que la línea de investigación deberá continuar con estudios comparativos. Se sugiere el empleo de medios líquidos para incrementar la sensibilidad del método. De la misma manera, se sugiere realizar estudios con un mayor tamaño de muestra. También se debe considerar excluir a todos aquellos participantes que hayan recibido antibioticoterapia en los 15 días previos a la toma de espécimen, así como a todos aquellos participantes que reporten productos de higiene bucal con antisépticos que modifiquen la microbiota bucal.

Conclusiones

En el presente trabajo, de una muestra poblacional de 41 sujetos no se identificó a uno solo que estuviera colonizado por *E. coli*; sin embargo, la presencia de otros bacilos Gram-negativos fue mayor al 30%. Existen factores higiénicos en la población evaluada que pudieron influir en este resultado, tales como el uso de enjuagues con clorhexidina; de igual manera, el método de muestreo pudo influir al no emplear medios líquidos.

Referencias

- Kazemian, H., Bourbour, S., Beheshti, M., & Bahador, A. (2017). Oral Colonization by Nosocomial Pathogens During Hospitalization in Intensive Care Unit and Prevention Strategies. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 12(1). <https://doi.org/10.2174/1574891X12666170215152854>
- Messika, J., la Combe, B., & Ricard, J.-D. (2018). Oropharyngeal colonization: epidemiology, treatment and ventilator-associated pneumonia prevention. *Annals of Translational Medicine*, 6(21), 426–426. <https://doi.org/10.21037/ATM.2018.10.17>
- Le, M. N. T., Kayama, S., Yoshikawa, M., Hara, T., Kashiyama, S., Hisatsune, J., Tsuruda, K., Onodera, M., Ohge, H., Tsuga, K., & Sugai, M. (2020). Oral colonisation by antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria among long-term care facility residents: prevalence, risk factors, and molecular epidemiology. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13756-020-0705-1>
- Nucleo, E., Caltagirone, M., Marchetti, V. M., D'Angelo, R., Fogato, E., Confalonieri, M., Reboli, C., March, A., Sleghele, F., Soelva, G., Pagani, E., Aschbacher, R., Migliavacca, R., Pagani, L., Farina, C., Fazii, P., Luzzaro, F., & Montanera, P. G. (2018). Colonization of long-term care facility residents in three Italian Provinces by multidrug-resistant bacteria. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S13756-018-0326-0>
- Sharma, N., Bhatia, S., Sodhi, A. S., & Batra, N. (2018). Oral microbiome and health. *AIMS Microbiology*, 4(1), 42–66. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.1.42>
- Zawadzki, P. J., Perkowski, K., Padzik, M., Mierzińska-Nastalska, E., Szaflik, J. P., Conn, D. B., & Chomicz, L. (2017). Examination of Oral Microbiota Diversity in Adults and Older Adults as an Approach to Prevent Spread of Risk Factors for Human Infections. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8106491>