

ALTA PREVALENCIA DE ANTIBIOTICO EN BACTERIA ORAL EN QUECHUAS BOLIVIANOS RESISTENCIA A DROGA ANTIMICROBIANA.

I.G. Pantoja-Feliciano (1),

Universidad de Puerto Rico,

San Juan, M.E. Pérez

Hospital Boliviano Japonés Sucre Bolivia

M. Mojica

Hospital Boliviano Japonés Sucre Bolivia

Greta Vargas-Pinto

Hospital Boliviano Japonés Sucre Bolivia

Gerardo Rios-Garcia

Hospital Boliviano Japonés Sucre Bolivia

K.P.Scott (3),

Rowett Reaserch Institute, Universidad de Aberdeen, Inglaterra

A. Patterson

Rowett Reaserch Institute, Universidad de Aberdeen, Inglaterra

H.J. Flint (3),

Rowett Reaserch Institute, Universidad de Aberdeen, Inglaterra

M.J. Blaser

Universidad de Nueva York, Nueva York-U.S.A

M.G. Domínguez-Bello *

Universidad de Puerto Rico,

*Autor correspondiente: Universidad de Puerto Rico- Departamento de Biología, Edificio Julio García Díaz. Lab 224
Casilla correo 70377 San Juan, PR 00936-8377 U.S.A.

Palabras Clave: Antibióticos resistencia a bacteria.

Key Words: Bacterial resistasnce antibiotic.

RESUMEN

Se selecciona antibióticos para poblaciones resistentes a bacteria, y desde luego se espera que la resistencia bacterial sea alta en lugares con alta exposición a antibióticos. En este estudio se ha comparado la presencia del gen resistente a la tetraciclina tet (M) en bacteria oral en sujetos de área rural y pacientes externos Quechuas de área urbana. En este estudio se incluyen 85 pacientes externos del Hospital de Sucre y 87 sujetos de habitantes de área rural. Se tomaron muestras orales, se logro extraer el ADN, y el gen resistente a la tetraciclina gen tet (M), común en bacteria oral fue amplificado. La resistencia encontrada fue 5.5 veces en pacientes exter-

nos urbanos (97%) que en los de área rural (84%; $p=0.0095$). En la comunidad rural las mujeres fueron 5.3 veces más las que tenían tet(M) oral (91%) que los hombres (65%). Los resultados nos confirman que la incidencia de genes resistentes a antibióticos antibacteriales es más alta en humanos en lugares de alta exposición, pero inclusive sujetos con baja exposición tienen también relativamente una alta prevalencia a la resistencia del antibiótico, sugiriendo que la elasticidad a genes resistentes en comunidades, en ausencia de presión selectiva del antibiótico, pueden evitar los esfuerzos para reducir la resistencia al antibiótico mediante la reducción del uso de los mismos.

SUMMARY

Antibiotics select for resistant populations of bacteria, and therefore bacterial resistance is expected to be high in settings with high antibiotic exposure. In this study we compared the presence of the tetracycline resistance gene tet(M) in oral bacteria from rural subjects and urban Quéchua outpatients. A total of 85 Sucre Hospital outpatients and 87 rural villagers were included in the study. Oral swabs were taken, DNA extracted, and the tetracycline resistance gene tet(M), common in oral bacteria, was amplified. Resistance was 5.5 times more likely to be found in the urban outpatients (97%) than in rural subjects (84%; $p=0.0095$). In the rural

community, women were 5.3 times more likely to have oral tet(M) (91%) than men (65%). The results confirm that the incidence of bacterial antibiotic resistance genes is higher in humans in high exposure settings, but even subjects with low exposure have a relatively high prevalence of antibiotic resistance, suggesting that the resilience of resistance genes in communities, in the absence of the selective pressure of the antibiotic, might jeopardize efforts to reduce antibiotic resistance by reducing antibiotic use.

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos tanto en medicina como en animales y producción agrícola ha causado el incremento de la resistencia bacteriana al antibiótico, (15) una amenaza a la efectividad terapéutica.

Las tetraciclinas han estado utilizándose ampliamente desde el año 1950, para tratar infecciones en humanos y en animales y como un promotor del crecimiento animal. (4, 18) Los mecanismos comunes de resistencia a la tetraciclina incluyen emanación mediante bombeo y protección ribosómica. (4, 18).

El microbio intestinal humano ha sido identificado como el reservorio de los genes resistentes al antibiótico. (19) Entre los genes que confieren resistencia a la tetraciclina, el gen de protección ribosómica tet(M) está generalmente presente en bacteria oral y fecal. (9, 11, 16, 21, 23)

Existen dos aproximaciones clásicas al estudio de resistencia antibiótica, la primera es aislar a la bacteria representativa en la comunidad y comprobar la resistencia a varios antibióticos (1, 12, 14) y la otra es determinar genes resistentes a un antibiótico determinado en toda la comunidad. (9, 23).

Hipóticamente determinamos que sujetos aislados en una comunidad rural tendrían que tener una prevalencia muy baja de genes resistentes comparándolos con pacientes externos del hospital. Para comprobar esta hipótesis se ha com-

parado el tet(M) oral como un gen común de resistencia al antibiótico oral en Quechuas de una comunidad tradicional remota, con pacientes externos del hospital ciudadano.

MATERIAL Y METODOS

Se han tomado muestras mediante hisopos orales a 172 Quechuas (107 mujeres y 65 varones, con edades entre 6 y 74 años) incluyendo 87 sujetos comunarios de la villa de Tarabuco y comunidades rurales cercanas, distantes a 65 kilómetros al noreste de Sucre, Bolivia, y a 65 pacientes externos del servicio del Hospital de Gastroenterología Boliviano – Japonés, en la ciudad de Sucre, los pacientes hospitalarios investigados fueron aquellos que consultaron por trastornos digestivos. Ninguno de los pacientes del hospital indicaron haber consumido antibióticos durante el mes anterior al estudio, y todos los voluntarios entregaron su consentimiento para su participación. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Sucre.

Los hisopos orales fueron obtenidos mediante la toma de muestras con hisopos estériles de la cara interna de cada mejilla, 10 muestras por individuo. El ADN fue extraído utilizando el AMP BUCAL TM; utilizando el **Kit de extracción del ADN** (Epicenter Biotechnologies, Madison, Wisconsin).

La presencia de bacteria fue confirmada mediante la amplificación del PCR del gen conservado 16S rRNA utilizando las cartillas 8F y 151 OR (13). Se detectó la presencia del tetM utilizando las cartillas tetM-FW y tetM-RV. (23) La temperatura de cocción fue de 52° C para los dos sets de cartillas. Resultados negativos del PCR fueron investigados para detectar la presencia de inhibidores PCR mediante ensayo de amplificación para control de ADN añadido positivo. Se utilizó análisis logístico para comparar la prevalencia de tetM por localidad, género y edad, utilizando el Programa Estadístico R (versión 2.6.0).

Riesgos relativos (OR) y 95% de intervalos de presunción fueron estimados para comparar las proporciones de tetM por género y localidad. El OR explica la probabilidad de que un evento pueda ocurrir cuando se comparan dos grupos: el grupo expuesto versus el grupo no expuesto.

RESULTADOS

Los datos demográficos de las 138 personas en los dos grupos quechuas se muestran en la Tabla 1 (59 de Sucre y 79 de Tarabuco).

Amplificamos el gen 16S rDNA en 59/85 pacientes urbanos y en 79/87 sujetos de área rural, que corresponden al 68% y 91% de las muestras de Sucre y Tarabuco, respectivamente; no se pudieron amplificar 34 muestras mediante el PCR y no fueron incluidas en el análisis estadístico. De todos estos 28 muestras tenían inhibidores PCR, como examinamos, añadiendo control positivo a las muestras.

57 de los 59 pacientes urbanos tenían bacteria oral con tet(M) (Tabla 2) La proporción en los sujetos de la comunidad rural también fue alta (84%) aunque más baja que la de los pacientes urbanos (p=0.0095).

Un análisis de riesgo relativo (OR) demostró que el tet(M) estaba presente 5.5 más veces en pacientes urbanos que en los sujetos de Tarabuco.

Lo interesante fue, que la prevalencia de resistencia al antibiótico en sujetos de área rural estaba estratificada por género (91% en mujeres, 65% en hombres; p=0.005; Tabla 2). En la comunidad rural las mujeres presentaban 5.3 veces más riesgo que los hombres de llevar tet(M) (OR Odds Ratio 1.3. 23. 9).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran una alta prevalencia de tet(M) en bacterias en la boca, inclusive en sujetos de una comunidad rural alejada en Bolivia. El gen resistente a la Tetraciclina es generalmente

TABLA N° 1
DATOS DEMOGRAFICOS DE LA POBLACION BOLIVIANA

	Sucre Pacientes externos (n=59)	Tarabuco Rurales (n=79)	TOTAL (n=138)
Edad (años)	39.06+/- 15.88	37.04+/-15.5	
Clasificación (años)	46 – 64	6-74	
% Mujeres	51	71	
Grupos por edad			
0-20	12	14	26
21-30	6	13	19
31-40	18	20	38
>41	23	32	55

TABLA N° 2
DISTRIBUCION DE tet (M) por genero en 59 pacientes de Sucre y 79 pacientes de área rural de Tarabuco

Sujetos	Mujeres (2)			Hombres		
	N	tet(M)	%	N	tet(M)	%
Pacientes Sucre(1)	39	29	97	29	28	97
Sujetos Tarabuco	56	51	91	23	15	65

(1) Riesgos relativos en el Hospital (OR) de Sucre portadores de tet(M) =5.5 (1, 2, 51, 9) comparados con Tarabuco

(2) OR en mujeres portadoras de tet(M) =5.3 (1, 3, 23, 9)

el tet(M) que es frecuentemente llevado sobre le Tn 916 unido o apareado a transportadores (8) y el integrador Tn916 se ha comprobado que es común en muestras orales, (21) y la transferencia ocurre entre estreptococos y entero cocos orales (17) Estos resultados son consistentes con lo observado de la alta resistencia de E. coli obtenida de las heces fecales de sujetos de área rural en Bolivia (12) y Perú (1).

La alta prevalencia de tet(M) en mujeres de las villas rurales en este estudio reflejan el mayor consumo de antibióticos en este grupo etareo. Esto es consistente con la mayor afluencia de mujeres en las postas medicas en Tarabuco, y son las que reciben mayor tratamiento médico que los hombres.

La alta prevalencia de resistencia a los antibióticos en la comunidad, en área rural con personas que no tienen acceso fácil a los antibióticos sugiere que la resistencia a los antibióticos debe ser adquirida sin la necesidad de consumir antibióticos, y que las bacterias resistentes se mantienen en el (microbio me) en ausencia de antibióticos, los reportes de bacterias resistentes a los antibióticos en animales salvajes (6) ha hecho que se piense que su medio ambiente no es primitivo. Sin embargo puede implicar que los genes resistentes a las bacterias pueden ser transmitidos y retenidos fácilmente.

Tener resistencia al antibiótico no es costoso en términos de eficiencia, sin embargo otros elementos pueden ser los causantes por los genes responsables.

Por ejemplo el cobre, (2) o el mercurio (5, 22) pueden incrementar la prevalencia de resistencia al antibiótico.

Los resultados de este estudio confirman que la exposición al antibiótico en personas con acceso a servicios hospitalarios y a antibióticos incrementa la prevalencia de genes resistentes, pero también confirman una aparente baja de costo de eficiencia asociada con genes resistentes al antibiótico en la ausencia de antibióticos (3, 7). La aparente elasticidad de bacteria resistente en ausencia de una selección de antibióticos pueden poner en riesgo medidas como por ejemplo limitar el uso de antibióticos (10, 20) que son necesarias para controlar el uso exagerado de antibióticos para comprender cuál es la línea base natural de resistencia antibiótica en comunidades microbianas, con el

propósito de comprender mejor cual es la prevalencia baja a la resistencia anti-biótica.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo ha sido parcialmente auspiciado por la beca (PRLSAMP) de La Alianza de Participación Minoritaria Louis Stoke de Puerto Rico. Agradecemos a las personas voluntarias y al personal médico ambulatorio de Tarabuco por su invalorable soporte a este estudio.

DECLARACION

Los Autores no tienen intereses para evitar su publicación.

BIBLIOGRAFIA

- BARTOLONI, A., L. PALLECCHI, H. RODRIGUEZ, C. FERNANDEZ, A- MANTELLA, F. BARTALESI, M. STROHMEYER, C. KRISTIANSOON, E. GOTUZZO, F. PARADISI, AND G- M- ROSSOLINI. 2009. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int J Antimicrob Agents* 33:125-9
- BERG, J., TOM-PETERSEN, AND O. NYBROE. 2005. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol* 40:146-51.
- BJORKHOLM, B., M. SJOLUND, P.G. FALK, O.G. BERG, L. ENGSTRAND, AND D.I. ANDERSSON. 2001. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc natl Acad Sci USA* 98:14607-12.
- CHOPRA, I., and M. ROBERTS. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232-60; second page, table of contents.
- DAVIS, I.J., A.P. ROBERTS, D. READY, H. RICHARDS, M. WILSON, AND P. MULLANY. 2005. Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. *Plasmid* 54:26-38.
- DOLEJSKA, M., A. CIZEK, AND I. LOTERAK. 2007. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *J Appl Microbiol* 100:11-9.
- ENNE, V. I., A. A. DELSOL, G.R. DAVIS, S.L.HAYWARD, J.M. ROE, AND P.M.BENNETT. 2005. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J Antimicrob Chemother* 56:544-51
- FLANNAGAN, S. E., L. A. ZITZOW, Y. A. Su, and D.B. CLEWELL. 1994. Nucleotide sequence of the 18-kb conjugative transposon Tn916 from *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 32:350-4
- GUEIMONDE, M., S. SALMINEM, and E. ISOLAURI. 2006. Presence of specific antibiotic (tet) resistance genes in infant faecal microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:21-5.
- KAZIMIERCZAK, K. A., AND K. P. SCOTT. 2007. Antibiotics and resistance genes: influencing the microbial ecosystem in the gut. *Adv Appl Microbiol* 62:269-92.
- LANCASTER, H., R. BEDI, M. WILSON, AND P. MILLANY. 2005. The maintenance in the oral cavity of children of tetracycline-resistant bacteria and the genes encoding such resistance. *J Antimicrob Chemother* 56:526-31.
- PALLECCHI, L., C. LUCCHETTI, A. BARTOLONI, F. BARTALESI, A. MANTELLA, H. GAMBOA, A. CARATTOLI, F. PARADISI, AND G.M. ROSSOLINI. 2007. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1179-84.
- PEI, Z., E. J. BINI, L. YANG, M. ZHOU, F. FRANCOIS, AND M.J. BLASER. 2004. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4250-5.
- PERRETEEN, V., VORLET-FAWER, P. SLICKERS, R. EHRLICH, P. KUHNERT, AND J. FREY. 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 43:2291-302
- PRUDHOMME, M., L. ATTAIECH, G. SANCHEZ, B. MARTIN, AND J.P. CLAVERYS. 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* *Science* 313:89-92.
- READY, D., J. PRATTEN, A. P. ROBERTS, R. BEDI, P. MULLANY, AND M. WILSON. 2006. Potential role of *Veillonella* spp. As a reservoir of transferable tetracycline resistance in the oral cavity. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2866-8.
- ROBERTS, A. P., G. CHEAH, D. READY, J. PRATTEN, M. WILSON, AND P. MULLANY. 2001. Transfer of TN916-like elements in microcosm dental plaques. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2946-6.
- ROBERTS, M.C.2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245:195-203.
- SALYERS, A. A., GUPTA, AND Y. WANG. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 12:411-6.
- SEPPALA, H., KLAUKKA, J. VUOPIO-VARKILA, A. MUOTIALA, H. HELENIUS, K. LAGER, AND P. HUOVINEN. 1991. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Abticrobial Resistance. *N Engl J Med* 337:441-6.
- SEVILLE, L. A., A. J. PATTERSON, K. P. SCOTT, P. LULLANY, M. A. QUAIL, J. PARKHILL, D. READY, M. WILSON, D. SPRATT, AND A.PROBERTS. 2009. Distribution of tetracycline and erythromycin resistance genes among human oral and fecal metagenomic DNA. *Microb Drug Resist* 15:159-66.
- SKURNIK, D., R. RUIMY, D. READY, E. RUPPE, C.BERNEDE, F. DJOSSOU, D. GUILLEMOT, G. PIER, AND A. ANDREMONT. Is exposure to mercury a driving force for the carriage of antibiotic resistance genes? *J. Med Microbiol:jmm* 0.017665-0.
- VILLEDIEU, A., M. L. DIAZ-TORRES, N. HUNT, R. MCNAB, D.A. SPRATT, M. WILSON, AND P. MULLANY.2003. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 47:878-82.