

Diseño de una PCR múltiple para la detección de proteínas del biofilm de *Escherichia coli* Uropatogénica en pacientes con infección en vías urinarias

PérezPedroza I.F.1, Rodríguez Olivas J.1, Herrera Vázquez A.1, López Briones S.1, Hernández Luna M.A.1

Departamento de Medicina y Nutrición, División Ciencias de la Salud. Universidad de Guanajuato Campus León.

1. Resumen

En la actualidad las infecciones de vías urinarias por cepas bacterias patogénicas son un problema de salud debido a la alta resistencia a antibióticos, no solo por la presencia de enzimas como las lactamasas, sino también por estructuras como el biofilm. La detección de cepas formadoras de biofilm debe ser de vital importancia para mejorar el tratamiento y reducir el uso de antibióticos. En este trabajo diseñamos una PCR múltiple, utilizando como molde a la cepa de *Escherichia coli* Uropatogénica CFT073, para que pueda ser utilizada como una herramienta en la identificación de cepas *Escherichia coli* Uropatogénica (UPEC) formadoras de biofilm en aislados clínicos de pacientes con infecciones en vías urinarias. Nuestros resultados muestran el diseño de la PCR para identificar las secuencias de ADN que codifican para las proteínas UpaB, UpaH, FimH e IHF, todas ellas participantes en la formación del Biofilm de UPEC. Así mismo, se estandarizó la técnica para medir el biofilm de UPEC con la tinción de cristal violeta y se encontraron las condiciones para la amplificación de UpaB por PCR. El diseño de esta herramienta ayudará a detectar las cepas formadoras de biofilm en

aislados clínicos y predecir una posible resistencia a antibióticos.

Abstract

Currently, urinary tract infections due to pathogenic bacterial strains are a health problem due to the high resistance to antibiotics, not only because of the presence of enzymes such as lactamases, but also due to structures such as biofilm. The detection of biofilm-forming strains should be of vital importance to improve treatment and reduce the use of antibiotics. In this work we designed a multiplex PCR, using as a template the strain of *Escherichia coli* Uropatogénica CFT073, so that it can be used as a tool in the identification of *Escherichia coli* Uropatogénica (UPEC) biofilm-forming strains in clinical isolates of patients with urinary tract infections. Our results show the PCR design to identify the DNA sequences of UpaB, UpaH, FimH and IHF, all of them proteins that participate in the UPEC Biofilm formation. Likewise, the technique for measuring UPEC biofilm with violet crystal staining was standardized and the conditions for the amplification of UpaB by PCR were found. The design of this tool will help to detect

biofilm-forming strains in clinical isolates and predict a possible antibiotic resistance.

2. Introducción

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las enfermedades infecciosas más comunes en la actualidad. De acuerdo a los registros obtenidos por el SINAVE en México las ITU varían dependiendo la edad y el sexo. En este aspecto se han reportado que entre un 10 y 20% de las mujeres presentan un episodio de ITU en su vida y un 3% de las mujeres pueden presentar ITUs de manera recurrente. Así mismo, las mujeres entre 1 y 50 años son las más afectadas [1]. En los hombres se presentan con mayor frecuencia después de los 50 años. En el 2012 reportaron 4,009,700 casos, calculando una tasa de incidencia de 3,430 por cada 100,000 habitantes [1].

El tratamiento con antibióticos es actualmente la medida de elección para el tratamiento de las ITUs. En el 2012 este tratamiento incluye antibióticos como tratamiento de primera línea trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMZ) 160/800 dos veces por día por tres días y como alternativa para casos donde existe resistencia a este antibiótico o que por otra causa no se pueda prescribir; nitrofurantoina 100 mg 2 veces al día por 7 días [5]. Este tratamiento es útil para controlar las exacerbaciones de las infecciones crónicas, pero, resulta insuficiente para la erradicación de infecciones con biopelículas, debido a que la concentración mínima para la erradicación de las biopelículas es difícil de alcanzar in vivo [4].

Las ITUs, son ocasionadas por distintas bacterias, siendo la más recurrente *Escherichia coli* uropatogénica o UPEC [2].

Las infecciones por *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC), representan un riesgo para la salud humana porque esta bacteria tiene la capacidad de formar la estructura conocida como biopelícula.

El biofilm o biopelícula es una comunidad de bacterias, que se caracteriza por la unión entre ellas. Las etapas de formación del biofilm son adhesión, colonización, maduración y dispersión [3]. Una vez que las bacterias se encuentran inmersas en esta matriz extracelular de sustancias polimerizadas producidas por ellas, presentan un fenotipo que modifica su índice de crecimiento, debido a los cambios en la transcripción de sus genes y puede contribuir a

la evasión de la respuesta inmune del huésped [4], además de la resistencia a antibióticos [3]. Las proteínas bacterianas que participan en la formación del biofilm son múltiples y sus mecanismos de regulación son poco conocidos en la actualidad. No obstante, las proteínas del biofilm dan a la bacteria el soporte vital para que pueda sobrevivir en ambientes hostiles y con ello brindar resistencia a ciertos antibióticos [6].

Algunas de las proteínas de UPEC que se han asociado a la formación del biofilm son: 1) FimH una proteína que forma parte de la fimbrias [7], 2) UpaH una proteína autotransportadora [8], 3) UpaB una proteína ubicada en la superficie celular que tiene diversas funciones incluyendo la adherencia a varias proteínas, y se ha observado que la delección del gen UpaB en la cepa CFT073 reduce significativamente la colonización temprana de la vejiga [9], y 4) IHF, perteneciente a la familia de proteínas DNABII, presente en el medio extracelular y asociada con el DNA extracelular, además IHF es crítica para la integridad estructural de las comunidades bacterianas, tomando un papel importante en el crecimiento del biofilm [10]. A la fecha no existe un método que permita identificar de manera rápida la presencia de bacterias como UPEC formadoras de biofilm, lo que permitiría aplicar y desarrollar mejores tratamientos. Por esta razón, en este trabajo, nos propusimos diseñar un método que permita la identificación de la presencia del biofilm, a través de la amplificación por PCR de las secuencias que codifican para las proteínas FimH, UpaH, UpaB y IHF, mediante una PCR múltiple.

3. Materiales y Métodos:

3.1.- Búsqueda de secuencias de proteínas.

Se realizó la búsqueda de publicaciones en revistas indexadas en JCR utilizando los términos "UPEC" y "biofilm" en PubMed. Se seleccionaron las publicaciones de acuerdo a los siguientes parámetros: 1) Proteínas relacionadas directamente con la formación, 2) Que las secuencias de ADN que codifican para las proteínas asociadas al biofilm estén registradas GenBank.

Las proteínas seleccionadas fueron: UpaB, UpaH, IHF y FimH, ya que cumplieron con las características mencionadas.

3.2.- Diseño de Primers para la amplificación de UpaB, UpaH, IHF y FimH

Se diseñaron los primers para amplificar las secuencias de UpaB GenBank: KP729058.1, UpaH GenBank: FJ719778, FimH GenBank: GQ487191.1 y IHF Gene

ID: 945533, utilizando los softwares Serial Cloner® versión 2.6.1 y OligoAnalyzer Tool de IDT®.

Los parámetros que se evaluaron fueron: Contenido de GC (55%), temperatura de alineamiento (T_m), formación de estructuras secundarias, y formación de homodímeros y heterodímeros.

3.3.- Ensayo de biofilm

El ensayo de formación de biofilm se realizó con la cepa CFT073 de UPEC. Brevemente, se descongeló la cepa en placas Petri de agar Luria Betani (LB). Las placas se crecieron por 24 horas a 37°C; posteriormente se resembró una colonia en caldo LB y se crecieron 24 horas a 37°C. A partir de este cultivo se realizó el ensayo del biofilm haciendo un subcultivo con una dilución de 1:1000 en 2 ml medio LB en placas de 12 pozos, que se incubaron por 24 y 48 horas a 37°C. Posterior a la incubación, la placa se lavó con agua destilada y se tiñó con Cristal Violeta al 1% por 15 minutos. Por último, se lavó la placa y se fotografió la formación del biofilm.

3.4.- Detección de UpaB por PCR

Se realizó un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineamiento óptima para la amplificación de UpaB por PCR a partir de una colonia de UPEC CFT073, utilizando el kit PCR Master Mix de Promega, siguiendo las instrucciones de fabricante. Las temperaturas utilizadas en el gradiente de temperatura se muestran en la Tabla 2.

La amplificación de UpaB se realizó en un termociclador de gradiente T100 marca Biorad, con las siguientes condiciones: 1) La lisis de las bacterias se realizó incubando a 95°C por 15 minutos., 2) La desnaturalización del DNA se realizó a 95°C por un minuto, 3) La alineación de los primers forward y reverse de UpaB se realizó en un rango de temperatura de 54.3 a 48.6°C por 30 segundos, 4) La extensión de las cadenas de DNA se realizó a 72°C por un minuto. Los pasos 2 a 4 se repitieron 32 veces, en el último se realizó una extensión final de 10

minutos a 72°C. Las muestras se almacenaron a 40C hasta su uso. 3.5- Electroforesis de ADN
Los productos de PCR del gradiente de temperatura de UpaB se corrieron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Las condiciones de la electroforesis fueron a 90 volts por 30 minutos. Por último, el gel de agarosa se 0.5µl SYBR safe en 60 ml de buffer TAE 1x y se dejó en agitación el gel de agarosa durante 15 minutos. Posteriormente se documentó el gel en un SmartDoc Accuris.

4.- Resultados y discusión

4.1.- Análisis de publicaciones

Para diseñar los primers que permitirán detectar la presencia de cepas de E. coli formadoras de biofilm por medio de una PCR múltiple, se hizo un análisis en la base de datos de “PubMed”, de artículos donde el tópico de la primera búsqueda fue las proteínas relacionadas con la formación del biofilm en UPEC. Se analizaron un total de 25 artículos, a partir de los cuales se escogieron a las proteínas UpaB, UpaH, FimH e IHF todas ellas asociadas a la formación del biofilm de UPEC y a partir de estas proteínas se busco en Genebank las secuencias de ADN que codifican para estas proteínas. Los números de acceso obtenidos son UpaB GenBank: KP729058.1, UpaH GenBank: FJ719778, FimH GenBank: GQ487191.1 y IHF GenBank: D82943.1

4.2.- Diseño de primers UpaB, UpaH, FimH e IHF:

Las secuencia nucleótidos que codifican para UpaB, UpaH, FimH y IHF se analizaron con los software Serial cloner e IDT oligoanalyzer. Los tamaños de los fragmentos a amplificar se muestran en la figura 1. Así mismo, las secuencias de los primers diseñados se muestran en la tabla 1. Todos los primers diseñados se

analizaron las secuencias, se compararon todos los primers, para identificar estructuras secundarias. Terminado el análisis de los primers y su diseño se llevaron a cabo PCRs virtuales por medio del programa SerialCloner en donde se introdujeron los primers diseñados y el gen completo que codificación para cada una de las proteínas seleccionadas. Terminados ambos

análisis se arrojaron los siguientes resultados:

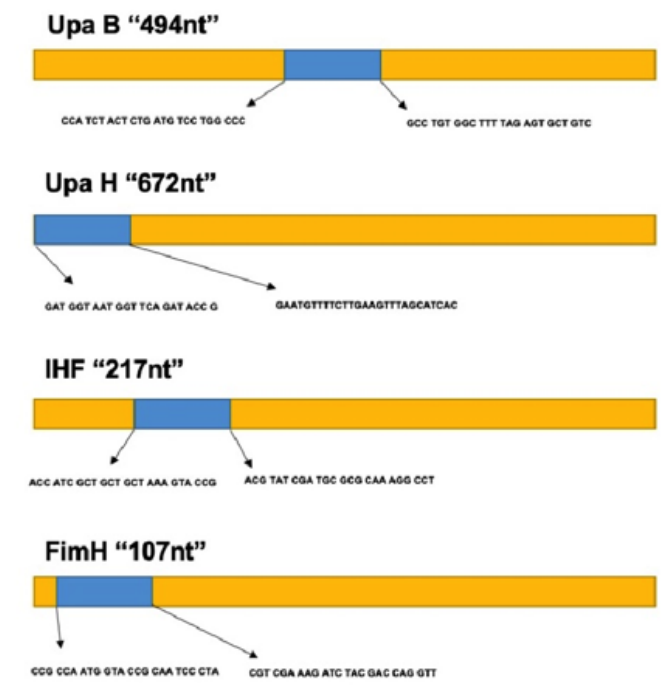


Figura 1. Representación esquemática de los productos de amplificación de las secuencias que codifican para UpaB, UpaH, FimH e IHF de UPEC.

Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación de secuencias de ADN de proteínas del biofilm de UPEC.

Proteína	GenBank	Secuencia de los Primers	Temperatura de alineamiento (°C)
UpaB	KP729058.1	F: 5' CCATCTACTCTGATGCTCTGGCCC 3' R: 5' GCCTGTGGCTTTTAGAGTGTCTGTC 3'	68.7 66.9
UpaH	FJ719778.1	F: 5' GATGGTAATGGTTTCAGATACCG 3' R: 5' GAATGTTTTCTTGAAGTTTAGCATCAC 3'	60.3 62.2
FimH	GQ487191.1	F: 5' CCG CCA ATG GTA CCG CAA TCC CTA 3' R: 5' CGT CGA AAG ATC TAC GAC CAG GTT 3'	68.7 65.2
IHF	D82943.1	F: 5' ACC ATC GCT GCT GCT AAA GTA CCG 3' R: 5' ACG TAT CGA TGC GCG CAA AGG CCT 3'	66.9 68.7

4.3.- Ensayo de biofilm

La incubación por 24 y 48 horas del subcultivo de la cepa CFT073 de UPEC en medio LB a 37°C forma la estructura del biofilm. Esta estructura es más evidente a las 48 horas de cultivo.

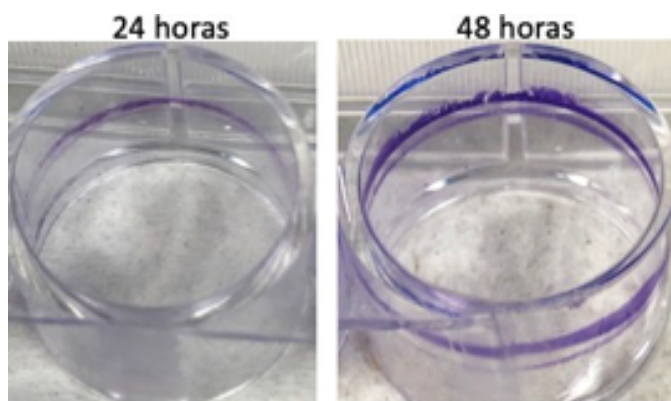


Figura 2. Formación del biofilm.

4.4.- Detección de UpaB por PCR de gradiente

Una vez generados los primers de UpaB, se llevó a cabo la PCR punto final con los reactivos y condiciones mencionados en material y métodos. Los productos de PCR se utilizaron en una electroforesis de agarosa al 1%. Los resultados obtenidos de la PCR muestran la amplificación del fragmento de ADN correspondiente a UpaB (figura 3). Las temperaturas analizadas se muestran en la tabla 2. El análisis densitométrico de las bandas del gel de agarosa se observó un incremento en la dimensión e intensidad de bandas en la temperatura 49 °C (Figura 4), por lo que se determinó que esta temperatura es la óptima para la mayor amplificación de UpaB.

Tabla 2. Gradiente de temperaturas utilizadas para la amplificación de UpaB.

Muestra	Temperatura °C	Densitometría
1	53.9	3.49
2	53.1°C	5.24
3	52.1°C	4.59
4	50.8°C	4.21
5	49.7°C	5.39
6	49°C	6.83

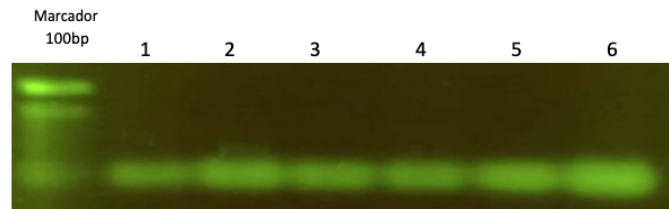


Figura 3. Amplificación de UpaB en un gradiente de temperatura



Figura 4. Análisis densitométrico de los productos de amplificación de UpaB en un PCR de gradiente de temperatura

5.- Conclusiones

En este trabajo se diseñó una prueba de PCR múltiple para detectar la presencia de cepas de UPEC formadoras de biofilm. Así mismo, se realizó un ensayo para detectar la estructura del biofilm, además de la detección por PCR de UpaB, una de las proteínas que participan en la formación del biofilm.

Es importante mencionar que el diseño de una PCR para detectar cepas de *E. coli* formadoras de biofilm podría ayudar a aplicar mejores tratamientos que garanticen la correcta erradicación de uno de los principales agentes causales de las ITUs. Así mismo, es importante mencionar que este tipo de pruebas son económicas, no invasiva y sencillas de realizar.

Por otra parte, conocer las proteínas que participan en la formación del biofilm y sus mecanismos de acción pueden ayudar a nuevos blancos terapéuticos que sirvan para diseñar fármacos que inhiban la actividad de las proteínas del biofilm y así combatir la colonización de la vejiga y/o riñón, además de casos crónicos de este tipo de infecciones, que normalmente están asociadas a la resistencia a antibióticos empleados. Por esta razón consideramos que deben seguir realizándose este tipo de estudios.

6.- Agradecimiento

Se agradece la colaboración de la QFB. Viridiana Olmeo Ramírez del Hospital General de Silao, por su apoyo para la realización de este proyecto.

7.- BIBLIOGRAFÍA:

1.- Número 43 | Volumen 30 | Semana 43 | Del 20 al 26 de octubre del 2013, Boletín epidemiológico. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica.

2.-Yang, X., Sha, K., Xu, G., Tian, H., Wang, X., Chen, S., Huang, N. (2016). Subinhibitory Concentrations of Allicin Decrease Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Biofilm Formation, Adhesion Ability, and Swimming Motility. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 979.doi:10.3390/ijms17070979

3.- Alicia, E. F. (2013). ApunteVI-BIOPELICULAS. Un desafío para entebder la patogénesis y la terapia antiinfectiva.

4.- Spaulding, C. N., Klein, R. D., Schreiber, H. L., Janetka, J. W., & Hultgren, S. J. (2018). Precision antimicrobial therapeutics: the path of least resistance? *Npj Biofilms and Microbiomes*, 4(1).doi:10.1038/s41522-018-0048-3.

5.- Abrego Olvira D. GPC diagnóstico y tratamiento de la infección aguda, no complicada del tracto urinario en la mujer. 1st ed. México: Gobierno Federal; 2009.

6.- Delcaru, C., Alexandru, I., Podgoreanu, P., Grosu, M., Stavropoulos, E., Chifiriuc, M., & Lazar, V. (2016). Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. *Pathogens*, 5(4), 65.doi:10.3390/pathogens5040065.

7.- ZAMANI, H., & SALEHZADEH, A. (2018). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, 48, 162–167.doi:10.3906/sag-1707-3.

8.- Allsopp, L. P., Totsika, M., Tree, J. J., Ulett, G. C., Mabbett, A. N., Wells, T. J. Schembri, M. A. (2010). UpaH Is a Newly Identified Autotransporter Protein That Contributes to Biofilm Formation and Bladder Colonization by Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Infection and Immunity*, 78(4), 1659–1669.doi:10.1128/iai.01010-09.

9.- Allsopp, L. P., Beloin, C., Ulett, G. C., Valle, J., Totsika, M., Sherlock, O., Schembri, M. A. (2011). Molecular Characterization of UpaB and UpaC, Two New Autotransporter Proteins of Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Infection and Immunity*, 80(1), 321–332. doi:10.1128/iai.05322-11.

10.- Devaraj, A., Justice, S. S., Bakaletz, L. O., & Goodman, S. D. (2015). DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Molecular Microbiology*, 96(6), 1119–1135.-doi:10.1111/mmi.12994.