

Presencia del biofilm y su asociación con la resistencia de antibióticos de cepas de aislados clínicos de *Escherichia coli* de pacientes con infecciones de vías urinarias

López González Gabriela Josefina¹, Barrera Chávez Isaac Daniel², García Andrade Alejandro², López Briones Sergio², Hernández Luna Marco Antonio².

¹Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato.

²Departamento de Medicina y Nutrición, Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, Campus León.

gj.lopezgonzalez@ugto.mx¹

Resumen

Las infecciones en vías urinarias (IVUs) son de las infecciones bacterianas más frecuentes en la población, siendo *Escherichia coli* (*E. coli*) el principal agente causal. Uno de los mayores problemas actualmente en el tratamiento de las IVUs es la resistencia a antibióticos, la cual está asociada principalmente a β -lactamasas. No obstante, en los últimos años uno de los mecanismos que ha generado interés, no solo por su participación en la resistencia a antibióticos, sino también porque su presencia en dispositivos médicos ocasiona complicaciones en la salud del paciente, es el biofilm. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos la presencia del biofilm y los genes que codifican para las proteínas de esta estructura, en aislados clínicos de *E. coli* obtenidas de pacientes con IVUs y su posible relación con la resistencia a antibióticos.

Palabras clave: Biofilm; resistencia a antibióticos; *Escherichia coli*.

Abstract

Urinary tract infections (UTIs) are the most frequent bacterial infections in the population and *Escherichia coli* (*E. coli*) is the principal causal agent. Currently, one of the major problems in the treatment of UTIs is antibiotic resistance, which is mainly associated with B-lactamases. However, in recent years one of the mechanisms that has generated interest, not only because of its role in antibiotic resistance, but also because of its presence in medical devices causing complications in the patient's health, is biofilm. Therefore, the presence of the biofilm and genes coding for the proteins of this structure in clinical isolates of *E. coli* obtained from patients with ITUs and their possible relationship with antibiotic resistance was evaluated in this work.

Keywords: Biofilm; antibiotic resistance; *Escherichia coli*.

Introducción

Las infecciones en vías urinarias (IVUs) constituyen una de las patologías infecciosas más frecuentes tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario. No sólo representan un problema clínico, sino que además tienen una gran repercusión económica por los costes sanitarios que representan. En los últimos años se han producido avances significativos en la patogenia de las IVUs, cambios sustanciales en los patrones de sensibilidad de los principales patógenos urinarios, con un incremento progresivo de las infecciones causadas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), lo que ha condicionado cambios en el tratamiento empírico de estas infecciones. Además, se ha desarrollado el concepto de “daño colateral”, que podríamos definir como el papel que tiene el consumo global de un determinado antibiótico en el incremento de las resistencias, no sólo al mismo sino a otros antibióticos, como se ha observado con el consumo global de quinolonas que incrementan las resistencias a dichos antibióticos, pero también a las cefalosporinas de 3ª generación y, por lo tanto, a un incremento de las infecciones causadas por BLEEs. Por ello, el incremento de la resistencia a antibióticos ha de condicionar no sólo cambios en la terapia empírica,

sino también en la aplicación de un uso racional de los antibióticos tanto en el tratamiento como en la prevención de las IVUs recurrentes¹.

Etiología

La invasión del aparato urinario sano está restringida a un grupo de microorganismos, conocidos como "uropatógenos", que son capaces de sobrepasar, soslayar o minimizar los mecanismos de defensa del huésped. Por ejemplo, para *Escherichia coli* (*E. coli*) se han identificado cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D); mientras que las cepas comensales derivan en su mayoría de los grupos A y B1, que a su vez poseen muy pocos factores de virulencia, las cepas uropatógenas derivan principalmente del B2 y tienen bastantes genes de virulencia. Los microorganismos que se aíslan de la orina varían según las circunstancias del paciente y sus enfermedades de base. La etiología de las IVUs se ve modificada por factores como la edad, la diabetes, la obstrucción del tracto urinario, las lesiones de médula espinal o la cateterización urinaria. Por ello, microorganismos raramente implicados en IVUs de población sana pueden causar enfermedad en pacientes con trastornos anatómicos, metabólicos o inmunológicos. La exposición a antibióticos y el antecedente de hospitalización también van a condicionar diferencias en el perfil etiológico. Más del 95% de las IVUs están causadas por una única especie bacteriana. *E. coli* causa entre el 75-95% de los episodios de cistitis aguda no complicada. *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* y enterococos son responsables de la gran mayoría de los episodios restantes. Los uropatógenos en la gran mayoría de las veces vienen de la propia microbiota intestinal. En pielonefritis no complicada, los agentes etiológicos son similares a los que causan cistitis no complicada y también es similar su patrón de resistencia a los antibióticos. En más del 80% de los casos de pielonefritis aguda el agente causal es *E. coli*².

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, en forma de bastón y no esporulante. Ampliamente estudiada debido a su alta presencia en nuestro organismo, también debido a la facilidad con la que se puede cultivar en el laboratorio. La mayoría de las especies de *E. coli* se encuentran en el intestino de organismos de sangre caliente³. *E. coli* es la bacteria anaerobia facultativa comensal más abundante de la microbiota de nuestro tracto gastrointestinal y junto con otros microorganismos es esencial para el funcionamiento correcto del proceso digestivo y se puede considerar como una bacteria "buena" ya que la mayoría de las especies no son patógenas y ayudan a prevenir la colonización de bacterias patogénicas. Sin embargo, existen especies de *E. coli* que son las causantes de diversas complicaciones, como es el caso de infecciones asociadas a dispositivos médicos, como catéteres uretrales e intravasculares, articulaciones y derivaciones e injertos protésicos. Las cepas asociadas a las infecciones gastrointestinales son denominadas *E. coli* diarreogénicas o intestinales, mientras que las asociadas a infecciones en otros aparatos y sistemas, como, por ejemplo, el tracto urinario, sanguíneo y nervioso, son denominadas *E. coli* patogénicas extraintestinales (ExPEC). Debido a que este tipo de cepas forma biofilm sus infecciones resultan difíciles de tratar farmacológicamente.

Sintomatología

La IVU puede ser sintomática, la cual se define como la presencia de síntomas clínicos atribuidos al tracto genitourinario en asociación con bacteriuria significativa o puede ser asintomática, definida por la presencia de bacterias en las muestras de orina en un paciente sin sintomatología urinaria. El diagnóstico etiológico de estas infecciones se demuestra por la presencia en orina de 100.000 o más UFC/ml, lo cual es indicativo de bacterias multiplicándose en el tracto urinario y, por tanto, recuentos bacterianos iguales o superiores a este umbral se han considerado como bacteriuria significativa indicativa de ITU; sin embargo, cifras que oscilan entre 1.000-10.000 UFC/ml deben considerarse significativo e indicativo de IVU, cuando proceden de muestras obtenidas adecuadamente y el paciente presenta síntomas urinarios específicos.

Una de las etapas en las cuales estas infecciones se presentan con mayor frecuencia son los adultos mayores, ya que estos tienen mayor susceptibilidad a las infecciones debido a los cambios fisiológicos asociados a la edad, como en el caso de los hombres, la hipertrofia prostática promueve la infección a través de la obstrucción uretral y en las mujeres posmenopáusicas la deficiencia de estrógenos y la condición anatómica de presentar menor longitud de la uretra y su proximidad al ano, aumentan el riesgo de infección por enterobacterias; para ambos sexos la presencia de procesos comórbidos que se asocian con vejiga

¹ (Pigrau, 2013), ² (Pigrau, 2013), ³ (Sharma et al., 2016), ⁴ (Rocaro, D. M. 2016), ⁵ (OMS, 2020), ⁶ (Flemming et al., 2016), ⁷ (di Domenico et al., 2017),

⁸ (Flemming et al., 2016),

neurogénica es probablemente el mayor factor predisponente para la aparición de IVU; enfermedades neurológicas degenerativas y enfermedades cerebrovasculares, suelen acompañarse de vejiga neurógena⁴.

Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo. Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos.

Son las bacterias, y no los seres humanos ni los animales, las que se vuelven resistentes a los antibióticos. Estas bacterias farmacorresistentes pueden causar infecciones recurrentes en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes⁵.

Biofilm

El biofilm se ha definido como “un agregado de bacterias” que están sumergidas en una matriz de sustancias extracelulares poliméricas (SEP) compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular (eADN)⁶. La formación del biofilm depende, la mayoría de las veces de estímulos percibidos como negativos del ambiente, como el pH, la temperatura o la disponibilidad de nutrientes. Las bacterias se adhieren a estructuras bióticas o abióticas, produciendo el SEP, permitiéndoles protegerse de los cambios en el ambiente, incluyendo la respuesta inmune del huésped y los antibióticos⁷. Los efectos del biofilm bacteriano han tomado relevancia en el ambiente hospitalario y la industria de alimentos principalmente, y han creado la urgencia de identificar y caracterizar esta estructura, con el objetivo de desarrollar nuevos métodos para la prevención, diagnóstico y el tratamiento de aquellas infecciones ocasionadas por bacterias que tienen la maquinaria para formar el biofilm debido a que este tipo de estructuras se han comenzado a asociar con otros mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de bacterias como *E. coli*⁸.

Objetivo

Determinar la asociación entre el biofilm y la resistencia de antibióticos de cepas de *Escherichia coli* de pacientes con infecciones de vías urinarias.

Material y métodos

Curvas de crecimiento bacteriano

Se realizaron curvas de crecimiento bacteriano de los aislados clínicos en medio Luria Bertani (LB) a partir de una dilución 1:1000 de un cultivo de 24 horas de las cepas de *E. coli*. Las lecturas se realizaron durante 6.5 horas por medio de espectrofotometría midiendo a una longitud de onda de 600 nm.

Resistencia a antibióticos

La resistencia a β -lactámicos se determinó creciendo las cepas de *E. coli* en Agar LB con ampicilina 100 μ g/mL. Como control se utilizó a la cepa multirresistente CDC AR 0346 de *E. coli*.

Cuantificación de biofilm

La presencia del biofilm se determinó a partir de un subcultivo de 24 horas de las cepas de *E. coli*, crecidas en medio LB en placas de 96 pozos y posteriormente teñidas con cristal violeta al 1%. Para la cuantificación del biofilm, el cristal violeta se disolvió en ácido acético al 30% y se cuantificó por espectrofotometría a 550 nm.

Detección de plásmidos

La detección de plásmidos se realizó utilizando el método de extracción por lisis alcalina por medio de SDS para romper las membranas bacterianas y desnaturalizar las proteínas, posteriormente se analizaron las muestras en un gel de agarosa al 1%.

Resultados

Curvas de crecimiento bacteriano

Nuestros resultados de las curvas de crecimiento de los aislados clínicos muestran una gran variabilidad entre el crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli*, no obstante, todas muestran el mismo comportamiento de crecimiento y todas ellas alcanzan la fase estacionaria alrededor de las 5 horas de cultivo. De forma interesante las cepas que muestran el menor y mayor crecimiento son las cepas control CFT073 y CDC-AR-0346 respectivamente, mientras que todos los aislados clínicos de *E. coli* evaluados, su crecimiento se encuentra entre estas cepas controles (figura 1).

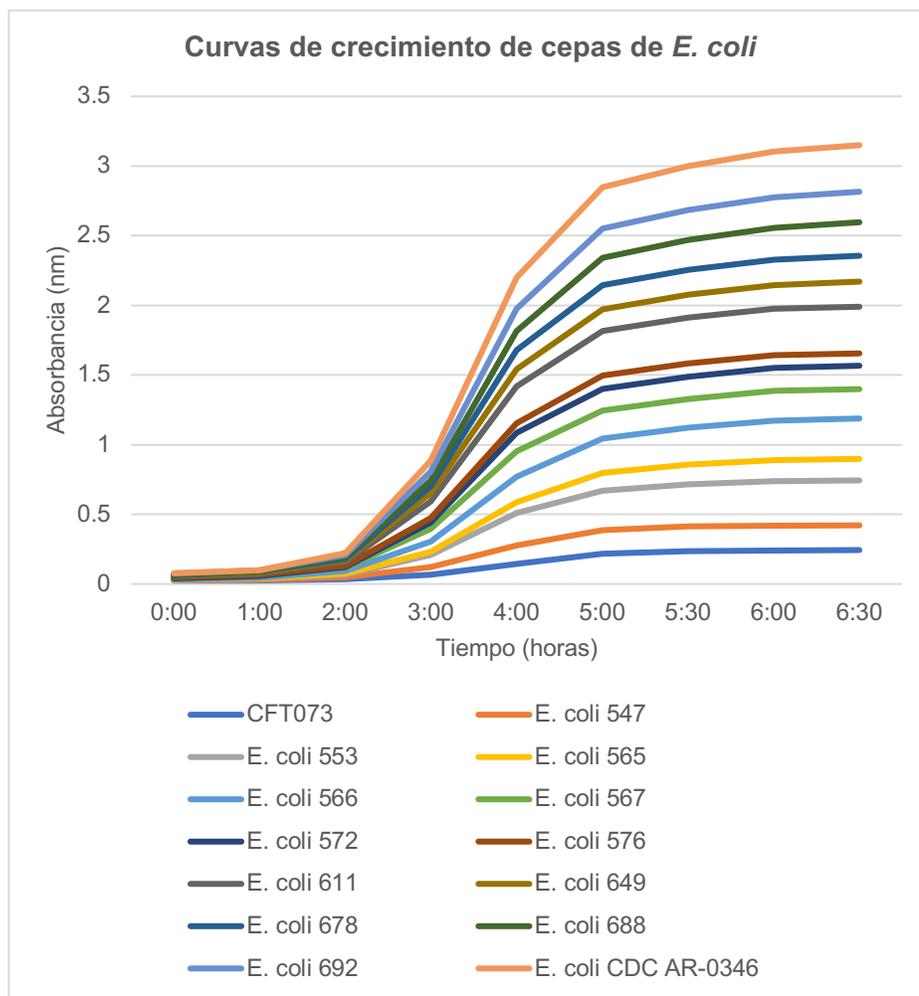


Figura 1. Curvas de crecimiento de 6.5 horas de las cepas de *Escherichia coli* en medio LB.

Presencia del biofilm y resistencia a ampicilina en aislados clínicos de *E. coli*

Para el ensayo del biofilm se utilizaron las 12 cepas de los aislados clínicos de *E. coli* de los pacientes con IVUs. Las cepas se crecieron en medio Luria Bertani por 24 horas y posteriormente se evaluó la formación del biofilm por la técnica de cristal violeta. En la figura 2 se muestra de forma representativa la formación del Biofilm en la cepa de laboratorio CFT073 de UPEC y dos aislados clínicos de *E. coli*.

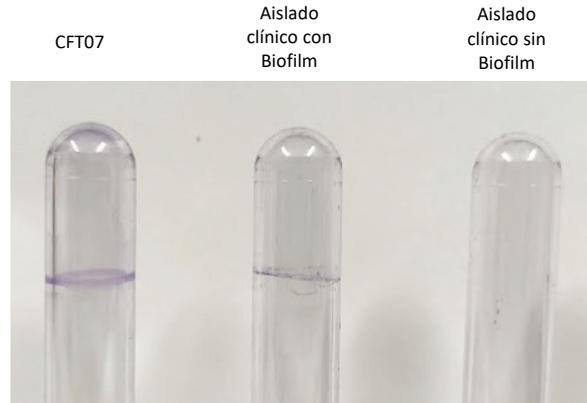


Figura 2. Formación del Biofilm

Nuestros resultados muestran que en comparación al biofilm formado por la cepa CFT073, cuatro de las 12 cepas analizadas mostraron una mayor formación, 5 mostraron una menor formación y solo una no presentó biofilm (figura 3). En cuanto al crecimiento en medio LB con ampicilina, la cepa que no presenta biofilm, una cepa con mayor formación y dos con menor formación del biofilm no crecieron en este medio, como control del crecimiento de las bacterias en ampicilina se utilizó la cepa multirresistente resistente CDC-AR 0346 (figura 4).

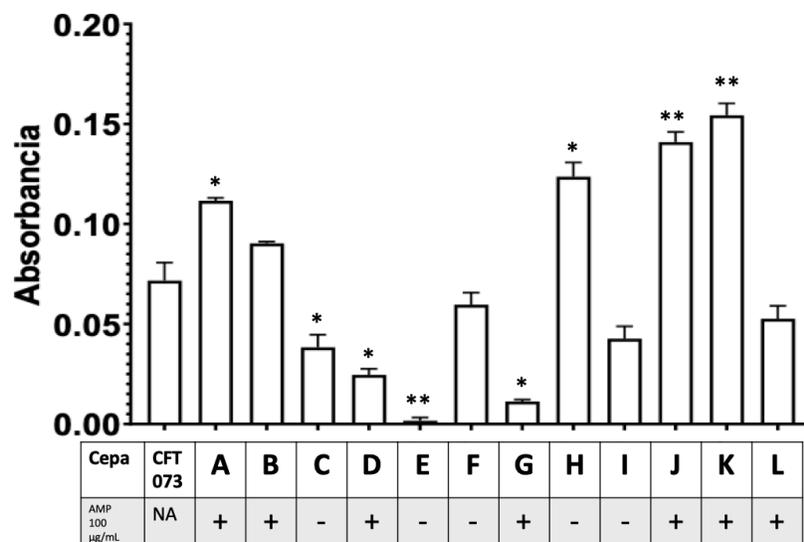


Figura 3. Cuantificación del biofilm en aislados clínicos de *E. coli* obtenidas de pacientes con IVUs. A: *E. coli* 547; B: *E. coli* 553; C: *E. coli* 565; D: *E. coli* 566; E: *E. coli* 567; F: *E. coli* 572; G: *E. coli* 576; H: *E. coli* 611; I: *E. coli* 649; J: *E. coli* 678; K: *E. coli* 688; L: *E. coli* 692.

Nombre del organismo

E. coli *E. coli* CDC AR-0346



Figura 4. Crecimiento bacteriano de *E. coli* CDC AR-0346 en Agar LB suplementado con ampicilina a 100 µg/mL.

Presencia de plásmidos en aislados clínicos de *Escherichia coli*

Debido a que la resistencia a antibióticos está principalmente asociado a la presencia de enzimas como las β-lactamasas, cuyos genes se encuentran en la mayoría de los casos insertados en plásmidos, buscamos la presencia de estos en los aislados clínicos de *E. coli* obtenidos de pacientes con IVUs. Nuestros resultados muestran la presencia de plásmidos en los aislados clínicos 566, 567, 572, 611, 688 y 692, como se muestra en la figura 5.

Marcador	CFT073	547	688	676	611	692	566	678	567	572	565	553	649
----------	--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



Figura 5. Presencia de plásmidos en cepas de *Escherichia coli* obtenidas de pacientes con infección en vías urinarias.

Conclusiones

En este trabajo evaluamos una posible asociación entre la resistencia a antibióticos como la ampicilina y la presencia del biofilm en aislados clínicos de *Escherichia coli* obtenidas de pacientes con infecciones en vías urinarias (IVUs).

En este trabajo encontramos diferencias entre el crecimiento, la presencia de plásmidos y el biofilm de todos los aislados clínicos de *E. coli* evaluados.

Nuestros resultados mostraron que las distintas cepas de *E. coli* se adaptan de manera distinta a un medio enriquecido como el caldo LB, lo cual se demuestra en la diferencia en las absorbancias que se obtuvieron al analizar las curvas de crecimiento. En cuanto a la resistencia bacteriana a los antibióticos, al ser sembradas en agar LB adicionados con ampicilina, se encontró cepas que son resistentes y cepas que fueron susceptibles a este antibiótico. De forma interesante, encontramos cepas de *E. coli* que presentan resistencia a antibióticos y no se encontró la presencia de plásmidos, por lo que la resistencia podría ser porque el gen de resistencia se ha insertado en el DNA genómico o bien podría ser mediada por el biofilm, sin embargo, necesitamos tener que corroborar esto con experimentos adicionales.

Finalmente, este trabajo muestra la importancia de las distintas técnicas de biología molecular, ya que, a través de ellas se demuestran varios de los problemas que se plantean actualmente como lo es la resistencia bacteriana y gran parte de la población no hace conciencia de ello. Como lo vimos ya hay una gran cantidad de cepas resistentes a los principales antibióticos que se usan en la práctica clínica diaria, por lo cual ahora se hace uso de fármacos más especializados pero que no están disponibles ampliamente en el sistema de salud, para hacerle frente a infecciones por patógenos que antes eran eliminadas "fácilmente" con las terapias a las cuales muestran resistencia. Se llegará a un punto en el que ni siquiera estas terapias especializadas puedan hacerles frente a estos microorganismos y aunque pareciera lejos encontrar ese panorama, estamos más cerca de lo que creemos, por lo que deberíamos empezar a actuar pronto, además de tomar más conciencia de que también la resistencia bacteriana puede ser transmitida mediante conjugación por lo que al seleccionar un antibiótico para eliminar una infección debemos estar seguros de que hizo de manera adecuada. También es importante tomar en cuenta al biofilm y no solo verlo como un término que no es práctico para la vida diaria, ya que como se ha demostrado está implicado en una gran cantidad de situaciones que van desde el cáncer hasta la propia resistencia a los antibióticos.

Referencias bibliográficas

- Pigrau, C. (2013). *Infección del Tracto Urinario*. Barcelona: SALVAT.
- Pigrau, C. (2013). *Infección del Tracto Urinario*. Barcelona: SALVAT. p.2-3.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*, 121(2), 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
- Rocaró, D. M. (2016). Agentes etiológicos de infecciones urinarias en adultos mayores de un centro de salud del estado Carabobo, Venezuela. *Kasmera* vol.44 no.1, 9.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antibióticos. Consultado en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos#:~:text=La%20resistencia%20a%20los%20antibi%C3%B3ticos%20se%20aceleran%20con%20el%20uso,fen%C3%B3meno%20y%20limitar%20su%20propagaci%C3%B3n>.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- di Domenico, E. G., Cavallo, I., Pontone, M., Toma, L., & Ensoli, F. (2017). Biofilm Producing Salmonella Typhi: Chronic Colonization and Development of Gallbladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1887. <https://doi.org/10.3390/ijms18091887>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>