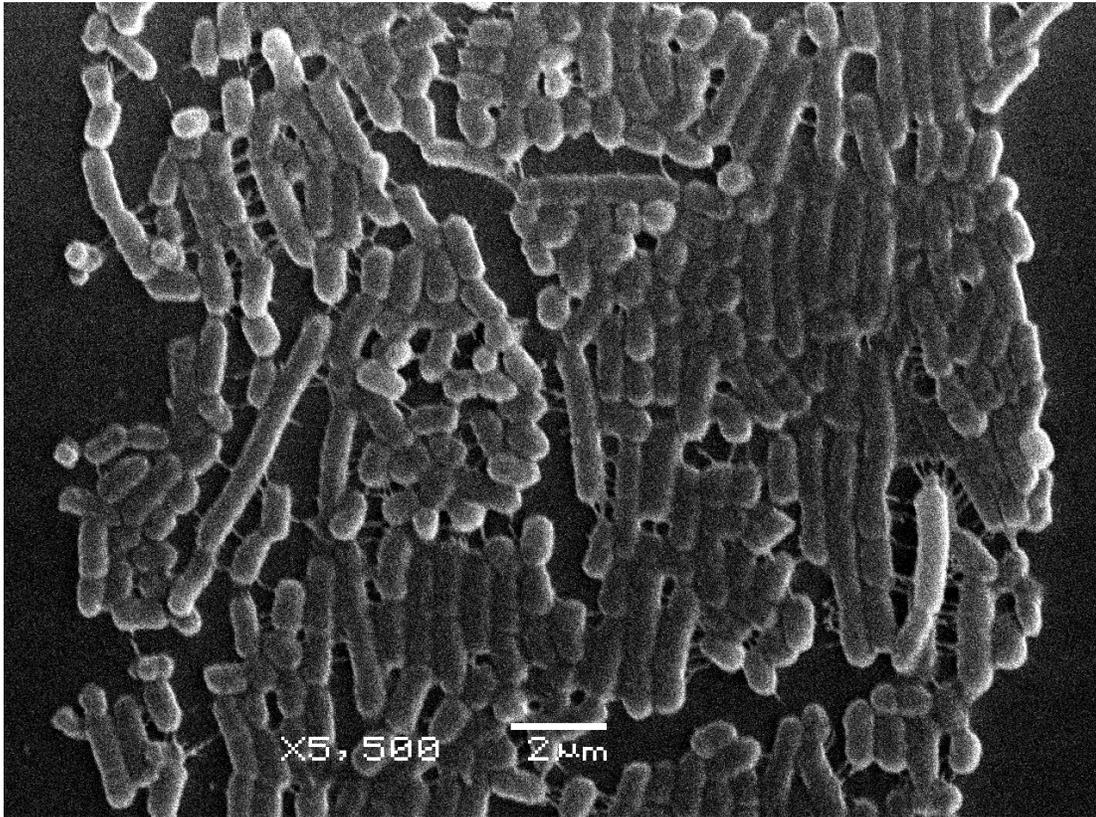


Universidad de la República

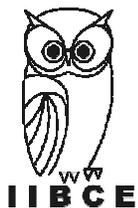
Facultad de Ciencias



Caracterización fenotípica de mutantes defectivas en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis*

Bach. Ana Laura Caetano

Tutora: Paola Scavone, PhD



Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Departamento de Microbiología

Montevideo, marzo de 2015

Índice

Índice.....	2
Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
Importancia de los biofilms y su rol biológico.....	6
Etapas en la formación de los biofilms.....	7
Importancia clínica.....	11
Infecciones del tracto urinario (ITU).....	11
ITU asociadas a catéteres (ITU-c).....	12
Proteus mirabilis.....	13
Uropatogénesis de <i>P. mirabilis</i>	14
Biofilms de <i>P. mirabilis</i>	16
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
Materiales y métodos.....	19
Cepas bacterianas.....	19
Condiciones generales de cultivo.....	19
Conservación de las cepas.....	19
Colección de cepas mutantes de <i>P. mirabilis</i> generadas mediante mutagénesis al azar.....	20
Selección de los transconjugantes por el método del cristal violeta.....	20
Evaluación de la capacidad de crecimiento en medio LB.....	21
Índice de hidrofobicidad.....	22

Análisis de las propiedades de la superficie bacteriana, utilizando Microscopía Electrónica de barrido (MEB).....	23
Resultados	24
Selección de las cepas	24
Selección de los transconjugantes por el método de cristal violeta	25
Evaluación en la capacidad de crecimiento en LB.....	26
Estudio de afinidad por sustrato no polar, ensayo de hidrofobicidad	27
Migración sobre catéteres.....	29
Movilidad swarming.....	31
Microscopía electrónica de barrido	33
Discusión.....	35
Selección de cepas mutantes de <i>P. mirabilis</i> con alteraciones en la formación de biofilms.....	36
Estudio de la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas mutantes en medios de cultivo clásicos.....	37
Determinación de la capacidad de adhesión a superficies abióticas.	37
Estudio de la capacidad de migrar sobre secciones de catéteres de uso clínico de distinto material.....	39
Evaluación de la movilidad swarming de las distintas cepas mutantes.....	40
Análisis de las propiedades de la superficie bacteriana.....	40
Conclusiones y perspectivas.....	42
Referencias	43
Anexo	49

Agradecimientos

A mi familia por estar siempre a mi lado.

A Sebastián por ser siempre mi pilar.

A la colonia que siempre está presente.

A Pablo Zunino por permitirme formar parte de este hermoso grupo.

A Victoria por enseñarme un montón de cosas nuevas y ayudarme.

Y a Paola que dio todo de sí incontables veces y siempre ser un apoyo.

Resumen

En la naturaleza las bacterias pueden crecer de formas diferentes, como bacterias planctónicas de libre flotación o formando biofilms. Los biofilms son comunidades microbianas sésiles cuyas células se encuentran adheridas entre sí y a un sustrato, embebidas en una matriz extracelular polimérica de producción propia y que exhiben un fenotipo distinto con relación a la tasa de crecimiento y expresión génica, respecto a sus contrapartes planctónicas. Tienen gran relevancia en sistemas naturales e industriales y en el contexto clínico están asociadas a infecciones en implantes médicos.

Proteus mirabilis es una bacteria Gram-negativa móvil que causa infecciones del tracto urinario complicadas, como las asociadas a catéteres urinarios (ITU-c) las que se relacionan además con la capacidad de formar biofilms en su superficie.

El principal objetivo fue caracterizar fenotípicamente mutantes de *P. mirabilis* con alteraciones en la formación de biofilms a partir de una colección de cepas mutantes generadas mediante mutagénesis al azar. Se seleccionaron aquellas con formación de biofilms disminuida respecto a la cepa parental y se estudió la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, propiedad física implicada en la afinidad por sustratos no polares relacionado con la adhesión. Se evaluó la habilidad de las cepas mutantes para migrar sobre secciones de catéteres urinarios comerciales, y la movilidad *swarming*. Además se analizó la dinámica de crecimiento a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos indicarían que la mutación no afecta la capacidad de crecimiento de las cepas. La mayoría de las cepas presentaron una superficie hidrofílica y algunas moderadamente hidrofóbicas. Los valores para la migración sobre catéteres mostró que todas las cepas son capaces de cruzar pero lo hacen en mayor proporción en látex. En cuanto a la movilidad *swarming* todas presentaron movilidad pero se observaron variaciones en los halos.

A partir de estos resultados concluimos que los genes identificados afectan diferencialmente la formación de biofilms y las propiedades fenotípicas de las cepas evaluadas.

Introducción

Los microorganismos se han definido y caracterizado como células planctónicas, de vida libre y se han estudiado empleando medios líquidos puros sobre la base de los cuales han surgido la mayoría de las evidencias fisiológicas, metabólicas y genéticas (Pratt & Kolter, 1999). Pese a esto la forma de vida predominante de los microorganismos en cualquier sistema biológico hidratado es una comunidad cooperativa denominada biofilm (Trautner & Darouiche, 2004). La primer descripción sobre los biofilms se remonta al siglo XVII cuando Van Leeuwenhoek examinó “animáculos” en su placa dental y la predominancia de los mismos fue expuesta por primera vez en 1978 por Costerton y colaboradores estudiando biofilms en ecosistemas acuáticos.

Actualmente los biofilms se definen como comunidades microbianas que se componen por células unidas irreversiblemente entre ellas y a un sustrato, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia y que presentan un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción génica (Donlan & Costerton, 2002).

Los biofilms pueden estar compuestos por una o múltiples especies bacterianas y son capaces de formarse sobre una amplia variedad de superficies bióticas y abióticas, así como en interfases aire-líquido (Adal & Farr, 1996; Archivald & Gaynes, 1997; Dickinson & Bisno, 1993). Aunque los biofilms formados por múltiples especies son más habituales en la naturaleza, los que constan de una sola especie revisten un interés particular debido a su importancia clínica. Estos últimos pueden desarrollarse tanto en implantes médicos como en tejidos, contribuyendo de esta manera a una variedad de infecciones persistentes (Costerton et al., 1999).

Importancia de los biofilms y su rol biológico

Los biofilms están implicados en numerosas enfermedades como fibrosis quística, tuberculosis, sinusitis y algunos tipos de enfermedad cardíaca. Así mismo, se asocian a problemas en otros ámbitos, como contaminación de alimentos y suministros de agua. Sin embargo, en algunos casos son

beneficiosos: tienen un rol esencial en el tratamiento de aguas residuales y en la descontaminación de ambientes, además de ser vitales para la salud de los ecosistemas (Hunter, P. 2008).

Representan un modo de vida protegido que favorece la supervivencia microbiana, lo que resulta en una mayor adaptación al estrés ambiental, principalmente frente a la radiación UV y desecación (Stanley & Lazazzera, 2004) y en una elevada resistencia a agentes antimicrobianos como antibióticos, desinfectantes y germicidas (Donlan & Costerton, 2002).

Etapas en la formación de los biofilms

La formación de biofilm consta de 5 etapas secuenciales bien definidas (Fig 1):

- i) Aproximación y adhesión reversible,*
- ii) Adhesión irreversible y producción de exopolisacárido (EPS)*
- iii) Formación de microcolonias*
- iv) Maduración*
- v) Dispersión*

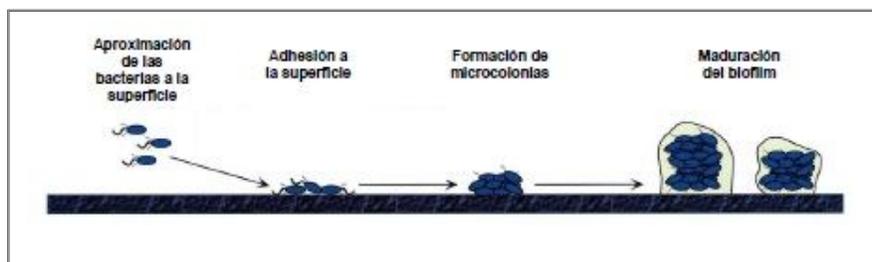


Fig 1. Etapas en la formación de biofilm (Schlapp 2009 modificado de Davey & O' Toole, 2000)

i) Aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie

Los microorganismos poseen múltiples vías genéticas que regulan el desarrollo de biofilms, lo que evidencia la complejidad de las señales que regulan este

proceso. Una misma especie puede utilizar distintas propiedades para crecer en forma de biofilms, dependiendo de las señales y condiciones que han activado su formación. Por ejemplo, se ha visto que *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en medios en diversas condiciones forma biofilms en casi cualquier medio de cultivo (O'Toole *et al.*, 2000).

Esta primera etapa comienza con la aproximación y censado por parte de las bacterias a la superficie y/o ambiente en donde se van a establecer (O'Toole *et al.*, 2000). La adhesión de las bacterias a las superficies esta mediada por factores no específicos como tensión superficial, hidrofobicidad y fuerzas electrostáticas (Darouiche, 2001), y factores específicos que incluyen varias estructuras de la superficie celular bacteriana como fimbrias, flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y EPS (Donlan, 2002). La adhesión inicial suele ser reversible, permitiendo a las células su desprendimiento de la superficie si las condiciones cambian (Nadell *et al.*, 2008).

ii) Adhesión irreversible y producción de exopolisacárido (EPS)

Luego del primer contacto de las células a la superficie, algunas de ellas se adhieren de forma irreversible al mismo.

Es en esta etapa en que comienza a producirse exopolisacárido (EPS) y su función es proporcionar adhesión entre células bacterianas para que pueda formarse un biofilm en varias capas (Joo & Otto, 2002). Como es altamente hidratado permite por medio de puentes de hidrógeno la incorporación de moléculas de agua. Pueden asociarse a cationes metálicos y a macromoléculas como el ADN, proteínas y lípidos. Este conjunto de sustancias conforman la matriz extracelular (Donlan, 2002). La formación de esta matriz es característica de los biofilms. La producción de EPS trae ventajas para las células comprendidas ya que las protege contra la desecación, brinda soporte estructural y defensa contra agentes antimicrobianos y células del sistema inmunitario (Dunne, 2002).

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana también juega un papel importante en la adhesión debido a que cuanto menos polar es una superficie involucrada,

mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas tienden a establecerse sobre ella. La mayoría de las bacterias contienen componentes hidrofóbicos en su superficie. Las fimbrias son apéndices no flagelares que no están involucrados en la transferencia de ácidos nucleicos, la mayoría de ellas contienen un alto porcentaje de residuos aminoacídicos hidrofóbicos, por lo que contribuyen a la hidrofobicidad total de la superficie bacteriana (Rosenberg & Kjelleberg, 1996). Se cree que el papel que juegan las fimbrias en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y en la adhesión está relacionado con la capacidad de vencer la repulsión electrostática inicial que existe entre la bacteria y el sustrato (Corpe, 1980).

iii) Formación de microcolonias

Luego de la adhesión irreversible de las células bacterianas a una superficie tiene lugar el desarrollo de microcolonias (unidad básica de la organización de un biofilm).

Las microcolonias se componen por comunidades bacterianas de unas 3 a 5 capas de microorganismos (Davey & O'Toole, 2000). Al mismo tiempo en que se multiplican se reclutan otras células planctónicas con el EPS que finalmente forman el biofilm. A medida que aumenta el número de células se incrementa la producción de EPS. En un volumen del 100% el EPS representa el 90% mientras que las bacterias el restante 10% (Stodley, 2013)

iv) Maduración

Luego de la adhesión irreversible la comunidad microbiana comienza el proceso de maduración. Incluye aumento de la tasa de replicación, aumento del espacio colonizado y también de la tasa de muerte dada la limitación de nutrientes disponibles. Existen también otros factores que regulan la maduración, como el pH interno, la osmolaridad, la disponibilidad de oxígeno y Carbono (Carpentier & Cerf, 1993).

Los biofilms maduros no son monocapas homogéneas de células microbianas sobre una superficie (Donlan & Costerton, 2002), sino que pueden presentar una arquitectura compleja, que comúnmente incluye microcolonias en forma de "hongo", rodeadas de matriz extracelular y separadas entre sí por canales que permiten la circulación de fluido (O' Toole 2000). La estructura de los biofilms maduros cambia constantemente debido a procesos internos y externos (Donlan & Costerton, 2002). La vida en un biofilm se considera exitosa y competitiva porque presenta una tasa de expresión diferencial de genes frente a las células planctónicas, son metabólicamente más eficientes y presentan protección y resistencia frente a varios factores de estrés (Lazar, 2011).

Entre las células del biofilm hay un proceso de comunicación celular y detección de densidad celular llamado *quórum sensing* (QS) (Fuqua et al. 1994). Este proceso es mediado por moléculas pequeñas producidas por las propias células del biofilm llamadas auto-inductoras. La síntesis de estas moléculas es regulada por la densidad celular, de forma que su concentración es una medida del número celular. En ausencia de estas moléculas los biofilms que se forman son más finos y uniformes (Lazar, 2011).

v) *Dispersión*

Las células que forman el biofilm pueden dispersarse mediante multiplicación de las células que se encuentran en proceso activo de crecimiento y posterior desprendimiento de las células hijas, como resultado de los niveles de nutrientes o *quórum sensing* (que tiende a disminuir), o por la remoción continua de pequeñas porciones del biofilm debido al flujo .

Aparentemente, el modo de dispersión afecta las características fenotípicas de los microorganismos. Los agregados grandes que se desprenden del biofilm tienden a retener algunas características como la resistencia a antimicrobianos, mientras que las células que se desprenden como resultado de la multiplicación celular adoptan rápidamente el fenotipo planctónico (Donlan, 2002).

Importancia clínica

La medicina moderna ha logrado, mediante el desarrollo de vacunas y el empleo de antibióticos, un cierto nivel de control de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes a antibióticos y el reconocimiento de las infecciones asociadas a biofilms, han desafiado a las ciencias médicas a encontrar nuevos métodos de prevención, control y tratamiento (Davey & O'Toole, 2000). Los mismos microorganismos durante millones de años han sobrevivido en la naturaleza y se han adaptado a otros ambientes haciendo uso de la vida en biofilms. En particular, los individuos que se encuentran en estado de salud comprometido, son especialmente susceptibles a ser infectados por estos patógenos oportunistas (Donlan & Costerton, 2002). Es bien conocido que algunas infecciones crónicas como otitis media, periodontitis, infecciones pulmonares producidas por *Pseudomonas aeruginosa* en paciente con fibrosis quística, así como aquellas asociadas a un amplio espectro de implantes médicos como catéteres urinarios e intravenosos, válvulas cardíacas prostéticas y dispositivos intrauterinos, son producidas por microorganismos que crecen en forma de biofilms (Davey & O'Toole, 2000; Donlan, 2002).

Infecciones del tracto urinario (ITU)

Las infecciones en el tracto urinario constituyen el tipo de infección más común en los humanos (Foxman, 2003). Se pueden clasificar como infecciones urinarias del tracto inferior y del superior. Dentro de las primeras encontramos a la cistitis en la que normalmente sus síntomas incluyen el aumento en la frecuencia al orinar, urgencia y disuria (dolor al orinar) (Guay, 2008). Dentro de las infecciones urinarias del tracto superior se encuentra la pielonefritis o infección de los riñones. Sus síntomas incluyen fiebre, náuseas, vómitos y

dolor. Las ITU superiores pueden evolucionar peligrosamente en bacteremia y septicemia (Kaye & Hessen, 1994). Una ITU del tracto inferior que no es atendida deriva en ITU superior.

Estas infecciones constituyen un problema sanitario y socioeconómico; entre un 40% al 50% en mujeres y 12% en los hombres tendrán al menos un episodio de ITU una vez en su vida (Cassell, 1991; Nielubiwicz & Mobley, 2010). Los infantes y lactantes forman también una población susceptible a ITU. Además de clasificarse en infecciones del tracto alto o bajo también se clasifican de acuerdo a la existencia de complicaciones en complicadas y no complicadas. Las ITU no complicadas se producen en pacientes aparentemente sanos mientras que las ITU complicadas suceden en pacientes comprometidos. Puede ser por malformación anatómica o funcional de tracto urinario, por presencia de alguna otra enfermedad, pacientes inmunocomprometidos o por cateterización de largo plazo. La mayoría de las infecciones no complicadas son causadas por *Escherichia coli*. Para las ITU complicadas en especial aquellas derivadas de cateterización a largo plazo no existe un único agente etiológico (Hooton et al., 2010; Nicolle, 2005) siendo *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* algunos de los microorganismos más frecuentes encontrados.

ITU asociadas a catéteres (ITU-c)

Uno de los implantes médicos más comúnmente usados son los catéteres urinarios. Estos son dispositivos tubulares de látex o silicona que se insertan por la uretra hasta la vejiga para eliminar la orina durante una cirugía o para prevenir la retención o control de la incontinencia urinaria (Kunin, 1987; Warren et al. 1989, Warren 1997; Darouiche, 2001; Jacobsen et al. 2008).

El uso de estos dispositivos por períodos cortos de tiempo (aproximadamente 7 días) conduce a infección del tracto urinario entre el 10% y 50% de los pacientes y llega al 100% en pacientes cateterizados por períodos prolongados (más de 28 días) (Stickler, 1996). El riesgo de adquirir una ITU-c aumenta en un 10% por cada día en el que el paciente permanece cateterizado (McLean et

al. 1997). A pesar de que la mayoría de los casos de bacteriurias asociadas al uso de catéteres son asintomáticos, una vez que se vuelven sintomáticos las secuelas resultantes pueden variar entre moderadas (fiebre, uretritis, cistitis) a severas (pielonefritis aguda, daño renal, formación de cálculos, bacteremia). Si no son tratadas, estas infecciones pueden llevar a urosepsis y muerte (Warren, 1997; Niel-Weise & van den Broek, 2005). Las ITU-c suelen ser recurrentes como consecuencia del desarrollo de biofilms cristalinos en los catéteres y resultan en morbilidad a largo plazo (Jacobsen et al. 2008). Estos biofilms no sólo provocan la incrustación y bloqueo de los catéteres, sino que aumentan la resistencia de las bacterias a la respuesta inmune del hospedero y a los antibióticos (Stickler & Zimakoff, 1994).

Dada la alta incidencia de las ITU-c nosocomiales (que representan más del 80%) los costos médicos totales son muy elevados (Warren, 1997; Stamm, 1991; Hartstein et al , 1981; Jarvis, 1996)

Proteus mirabilis

P. mirabilis es una bacteria Gram negativa móvil perteneciente a la familia de las enterobacterias. Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en varios ambientes, incluyendo aguas contaminadas, suelo y heces, donde *Proteus* cumple un rol en la descomposición de materia orgánica, así como en el tracto digestivo de los mamíferos (Jacobsen et al. 2008; Nicolle 2005; Hooton et al 2010).

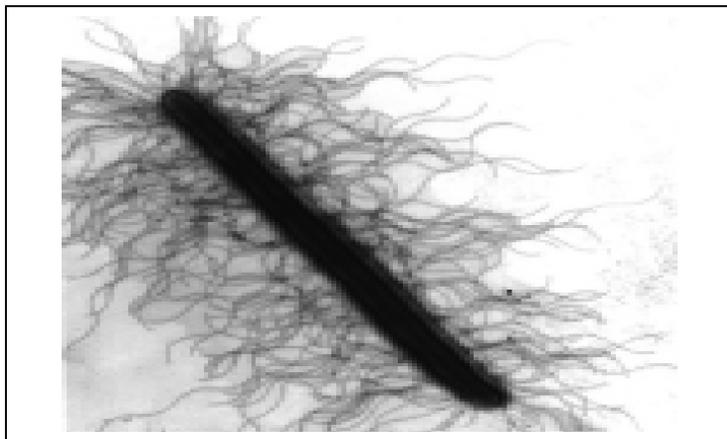


Fig. 2 Micrografía electrónica de *P. mirabilis* (Belas 2014).

P. mirabilis posee algunas características distintivas dentro de la familia de las enterobacterias. Presenta un comportamiento multicelular durante la migración en medios sólidos denominada *swarming*, donde se produce una diferenciación desde una forma unicelular vegetativa o *swimmer*, típica de medios líquidos, a una forma multicelular elongada hiperflagelada denominada *swarmer* (Belas, 1996).

Aparece como el tercer agente más comúnmente asociado a ITU después de *E. coli* y *K. pneumoniae* (Rozalski *et al.*, 1997) y en particular en individuos con anomalías estructurales o funcionales del tracto urinario. Se relacionan también a infecciones ascendentes en pacientes sometidos a cateterización prolongada (Warren *et al.*, 1982) y dentro de éstas su incidencia en ITU-C es mayor al 44% (Mobley, 1996). Presenta una particular afinidad por el tracto urinario superior, donde puede provocar grave daño renal (Senior, 1979).

Uropatogénesis de P. mirabilis

La capacidad de diferenciarse de célula *swimmer* a *swarmer* en la uropatogénesis de *P. mirabilis* ha sido tema de debate. Algunos autores han relacionado esta motilidad con la capacidad de colonizar el tracto urinario (Allison *et al.*, 1994; Mobley *et al.*, 1996) y otros reportes sugieren que no sería crítica para producir infección (Legnani-Fajardo, 1996; Zunino *et al.*, 1994). Por otro lado, la movilidad *swarming* se ha vinculado con la habilidad del patógeno para colonizar las superficies de los catéteres (Sabbuba *et al.*, 2002; Stickler *et al.*, 1993). *P. mirabilis* se distingue también por la producción de altos niveles de ureasa, enzima que hidroliza la urea presente en la orina generando amoníaco, el cual eleva el pH local a valores mayores a 7.2 y puede conducir a la precipitación de minerales como fosfatos de calcio y de magnesio que normalmente son solubles (Mobley, 1996). Este fenómeno tiene varias implicancias clínicas, como su asociación directa con la formación de cálculos en tracto urinario y su contribución en la patogénesis de pielonefritis e incrustación de catéteres (Mobley & Hausinger, 1989). La incrustación mineral

se manifiesta en la obstrucción del flujo urinario a través del catéter, lo que lleva a serias complicaciones como retención de orina, distensión de la vejiga, e ITU ascendente que puede culminar en episodios de pielonefritis, septicemia y shock endotóxico (Kunin, 1997; Mobley, 1996).

P. mirabilis se destaca además por la co-expresión de varios tipos de fimbrias (Mobley & Belas, 1995), que son apéndices proteicos filamentosos que emergen de la superficie bacteriana (Duguid *et al.*, 1955). *P. mirabilis* es el microorganismo con el mayor número de operones fimbriales (17) en su genoma (Pearson *et al.*, 2008). Las fimbrias de *P. mirabilis* se han implicado en su capacidad para adherirse al uroepitelio, propiedad que contribuye de forma relevante en su uropatogénesis (Coker *et al.*, 2000). Hasta el momento se han identificado y estudiado las fimbrias MR/P (Mannose Resistant *Proteus*-like), PMF (*Proteus mirabilis* Fimbriae), UCA (Uroepithelial Cell Adhesin), y ATF (Ambient Temperature Fimbriae) (Mobley *et al.*, 1996).

Los flagelos son organelos que le permiten a la bacteria su desplazamiento tanto en soluciones líquidas como sobre superficies sólidas. Además participan en los estados iniciales de adhesión de las bacterias en la formación de biofilms (Belas, 2014).

Los flagelos de *P. mirabilis* son importantes para la movilidad *swarming*. Teniendo en cuenta que la habilidad de *P. mirabilis* de diseminarse desde el sitio inicial de colonización en la superficie del catéter hasta las células uroepiteliales del tracto urinario es crítica para poder establecer ITU-c, la movilidad flagelar tiene un papel importante en este tipo de infecciones. El *swarming* es un proceso de diferenciación multicelular inducido que les permite a los microorganismos moverse de manera coordinada y expandirse sobre una superficie sólida (Mobley & Belas, 1995; Rather, 2005; Williams & Schwarzhoff, 1978). Las células *swarmer* migran desde el sitio original de inoculación de una manera rápida y altamente coordinada que depende de interacciones multicelulares y señalización célula-célula (Belas, 1992).

Biofilms de P. mirabilis

La capacidad de *P. mirabilis* para formar biofilms ha sido estudiada por numerosos autores (Stickler et al., 1993; Donlan, 2002; Mobley & Belas, 1995). Una vez que coloniza la superficie del catéter en una ITU- c *P. mirabilis* forma biofilms cristalinos. Los biofilms favorecen la supervivencia de *P. mirabilis* en el tracto urinario permitiendo que se adhieran al uroepitelio, los protege contra la acción del sistema inmunitario del hospedero y acción de antimicrobianos (Hoyle et al., 1992). Este tipo de biofilms causan incrustaciones capaces de bloquear los catéteres, lo que los vuelve especialmente problemáticos. Un elemento esencial en la formación de cristales y por lo tanto en el desarrollo de biofilms cristalinos, es la enzima ureasa producida por *P. mirabilis* (Musher et al. 1975). La urea presente en la orina humana llega a concentraciones de hasta 500 mM (Breitenbach & Hausinger , (1988).; Jones & Mobley,1987), por lo que las ureasas bacterianas juegan un rol importante en las ITU causadas por *P. mirabilis* (Griffith et al.,1976). Esta enzima actúa en presencia de urea, por lo que se asume que se expresa durante el crecimiento en orina (Jacobsen et al., 2008). La ureasa contribuye al desarrollo de cristales, cataliza la hidrólisis de urea en dióxido de carbono y amoníaco, el cual alcaliniza el medio local. Este aumento en el pH de la orina provoca la precipitación de fosfato de calcio y fosfato de magnesio-amonio, formando cristales de carbonato de apatita y carbonato de estruvita respectivamente (Griffith et al.,1976). Estudios revelaron que el pH de la orina es un factor determinante en la adhesión cuando fluye sobre películas lisas. Algunas con superficies hidrofílicas altamente electrón dadoras resisten la colonización de *P. mirabilis* cuando se hacen pruebas con orina ácida o a pH 6. Sin embargo a pH básicos se encontró fosfatos de calcio y magnesio fuera de la solución formando agregados macroscópicos (cristales) y las bacterias que se encontraban en la orina se instalaron en la superficie e iniciaron la formación de los biofilms cristalinos y obstruyen eventualmente el flujo de la orina (Stickler et al., 2006; Stickler et al., 2014).

Múltiples factores ambientales como el pH urinario, de adhesión como proteínas, fimbrias, flagelos, de degradación como proteasas y la

predisposición del individuo son importantes en la infección y posterior formación de biofilms cristalinos de *P. mirabilis*. Aun así la biogénesis en la formación de esta estructura para este microorganismo no es completamente conocida.

Hipótesis

Diversos genes están involucrados en la formación de biofilms de *P. mirabilis*, los cuales pueden además tener un papel en propiedades de la superficie bacteriana (hidrofobicidad), movilidad *swarming* y migración sobre superficie de catéteres urinarios.

Objetivos

Objetivo general

- Caracterizar fenotípicamente mutantes de *Proteus mirabilis* defectivas en la formación de biofilms.

Objetivos específicos

- Seleccionar cepas mutantes de *P. mirabilis* con alteraciones en la formación de biofilms.

-Estudiar la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas mutantes en medios de cultivo clásicos.

-Determinar la capacidad de adhesión a superficies abióticas.

-Evaluar la movilidad *swarming* de las distintas cepas mutantes.

-Estudiar la capacidad de migrar sobre secciones de catéteres urinarios de distintos materiales.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se empleó una cepa salvaje de *P. mirabilis* 2921 aislada de la orina de un paciente con ITU sintomática. Esta cepa presenta resistencia a tetraciclina, eritromicina, polimixicina y es sensible a ampicilina, tiene movilidad swarming, es productora de hemolisina y ureasa (Zunino et al., 2000). Además, se empleó una colección de mutantes obtenidas por mutagénesis al azar por transposición previamente generada en el laboratorio.

Resultados previos confirmaron la capacidad patogénica de la cepa *P. mirabilis* Pr2921 así como su habilidad para formar biofilms (Zunino et al., 2001; Zunino et al., 2003; Schlapp et al., 2011).

Condiciones generales de cultivo

Para los cultivos bacterianos se utilizaron cultivos aerobios a 37 ° C en caldo LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, pH 6.8) o LB agar en caso de necesitar un medio sólido (LB caldo suplementado con 1.5% de Agar bacteriológico) los que se incubaron a 37°C. Los medios fueron suplementados con los antibióticos kanamicina (concentración final 40 µg/mL) y tetraciclina (concentración final de 15 µg/mL) si las cepas bacterianas lo requerían.

Los tiempos de incubación variaron de acuerdo a la técnica empleada (4h, 24h y 48h).

Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron a -80° C en medio LB con glicerol al 20% como crioprotector.

Colección de cepas mutantes de P. mirabilis generadas mediante mutagénesis al azar

Con el fin de identificar los posibles genes involucrados en la formación de biofilms, se empleó una biblioteca de mutantes de *P. mirabilis* generada mediante mutagénesis al azar por inserción del transposón *miniTn5*. La biblioteca de mutantes fue generada por el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Para ello se empleó un sistema de conjugación en el cual se utilizó como cepa parental salvaje *P. mirabilis* (Pr2921) y como cepa donadora *E. coli* S17-1 λ pir con el plásmido p-BAM1. El método de screening para la selección de los mutantes afectados en su capacidad de formar biofilm se basó en la técnica de cultivo en placas de microtitulación y tinción con cristal violeta que se explica en la sección 2.

<i>P. mirabilis</i> (Pr 2921) Amp^s, Tet^R	<i>E. coli</i> S17-1 λpirTet^S Km^R
Clones transconjugantes (Km^R/Tet^R)	

Los clones transconjugantes fueron verificados para una única inserción del transposón mediante la técnica de Southern Blot (Iribarnegaray V., 2014). La identificación del sitio de inserción y por lo tanto del gen interrumpido se realizó por PCR arbitraria y posterior secuenciación de los productos obtenidos (Tuja A, APIPE 2014.).

Selección de los transconjugantes por el método del cristal violeta

La capacidad de formación de biofilms de las distintas cepas mutantes de *P. mirabilis* se determinó mediante un método semicuantitativo que se basa en la habilidad de las bacterias para formar biofilms en superficies abióticas. Este método permite estimar de manera indirecta el biofilm adherido a los pocillos de poliestireno mediante tinción con cristal violeta (Pratt & Kolter, 1998).

El procedimiento consistió en colocar en una placa de 96 pocillos de poliestireno, 150 μ l/pocillo de medio líquido LB. Los clones previamente ordenados en medio sólido (LB agar) se transfirieron a las placas y se incubaron durante 24 h a 37°C. Estos cultivos iniciales, o precultivos, se prepararon con el doble objetivo de estandarizar la concentración bacteriana de partida y de lograr que las mismas se encontraran en etapa exponencial de crecimiento al momento de inocular los cultivos finales.

Transcurrido dicho tiempo, en una placa nueva de 96 pocillos, se colocaron 180 μ l/pocillo de medio de cultivo LB y de la placa previamente incubada se transfirieron 20 μ l/pocillo de los cultivos. Se realizó una incubación de 48 h a 37°C sin agitación.

Posteriormente se removió el medio, y se realizaron lavados con agua destilada. Las bacterias adheridas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,1% durante 15 minutos.

El exceso de colorante se removió mediante lavados con PBS (hasta que no se observó color), se solubilizó el CV agregando etanol (95%) y se realizó la medida de absorbancia a 590 nm. Todas las cepas fueron evaluadas por duplicado.

Evaluación de la capacidad de crecimiento en medio LB

La capacidad de crecimiento en las cepas defectivas en la formación de biofilms se evaluó dado que esta no se debería alterar por la mutación. Para ello se realizaron las curvas de crecimiento en base a medidas de absorbancia a 600 nm. Se realizaron pre cultivos como se describió anteriormente en placas de microtitulación de 96 pocillos y se incubaron durante 24h a 37° C. Transcurrido dicho tiempo, 20 μ l del precultivo se adicionaron a 180 μ l/pocillo de LB en una nueva placa. Este cultivo se incubó 24h a 37° C y se evaluó la absorbancia a 600 nm cada dos horas.

Índice de hidrofobicidad

Este ensayo se basa en que la hidrofobicidad celular potencia la afinidad bacteriana por sustratos no polares como son las superficies plásticas e influye en la adhesión bacteriana (*Bibloni et al 2001*).

A partir de cultivos bacterianos en LB agar e incubados durante 24h a 37°C se realizaron cultivos en 5 mL de caldo LB y se incubaron durante 48 h a 37°C de forma estática. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de cultivo y se centrifugó 10 min a 10000 rpm, el pellet se lavó con 1mL de PBS. Luego se preparan suspensiones bacterianas en 1.5 mL de PBS a una DO inicial de 0.8 medido a 540nm (Δ_0). A un 1mL de la suspensión se le agregó 200 μ L de Xilol (=Xileno) y se vortexeó durante 2 min. Los tubos se dejaron decantar durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la separación entre fases (fase orgánica=xilol y fase acuosa=PBS+bacterias). Se midió la DO a 540nm de la fase acuosa (Δ_1), tomando aproximadamente 700 μ L y se calculó el índice de hidrofobicidad (Hi).

$$Hi = \frac{(\Delta_0 - \Delta_1)}{\Delta_0} \times 100$$

El ensayo se realizó por triplicado.

Migración sobre superficies de catéteres

El ensayo para evaluar la capacidad de las cepas bacterianas para migrar sobre superficies de catéteres urinarios se realizó en base al procedimiento propuesto por Sticker & Hughes (1999). Se prepararon placas con 12 mL de LB agar a las cuales se les removieron dos canales de medio de 1 cm. Se realizaron precultivos bacterianos en 5mL de LB incubados durante 4h a 37°C con agitación. Transcurrido dicho tiempo se colocaron 10 μ L de los cultivos previamente realizados en el borde de cada canal (3 por placa) y se dejó secar a temperatura ambiente. Por otra parte se cortaron en forma aséptica secciones de catéteres de silicona y látex de 1 cm de largo por 0,4-0,5 cm de ancho y se colocaron a modo de puente en el canal. Como control negativo a

uno de los inóculos no se le colocó el puente. Las placas se incubaron durante 24h a 37°C, realizando 15 réplicas para cada cepa.

Se calculó el índice de migración como el porcentaje de puentes que son cruzados por cada cepa.

Movilidad swarming

Para evaluar la movilidad swarming de las distintas cepas, se colocaron 10 µL de los cultivos de cada cepa mutante y de la cepa salvaje (realizados como se explicó en el numeral 5 durante 4h de incubación a 37°C en agitación) en el centro de una placa que contiene agar LB. Luego, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y se incubaron 24h a 37°C. La movilidad swarming se calculó como el área de crecimiento bacteriano sobre las placas de agar LB.

Análisis de las propiedades de la superficie bacteriana, utilizando Microscopía Electrónica de barrido (MEB).

Aquellas secciones de catéteres que fueron cruzados por las cepas se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % y se enviaron para su procesamiento y observación en el Servicio de Microscopía de la Facultad de Ciencias mediante microscopía electrónica de barrido.

Como control se emplearon secciones de catéteres urinarios estériles de cada material utilizado (látex y silicona).

Resultados

Selección de las cepas

Las cepas mutantes seleccionadas fueron aquellas que tenían una única inserción del transposón y por lo tanto una única interrupción génica. Esto se verificó mediante la técnica de Southern Blot y los clones que presentaron una sola inserción fueron caracterizados. Se obtuvo un total de 38 mutantes diferentes. En el presente trabajo nos centraremos en los clones caracterizados genéticamente mediante secuenciación de la zona adyacente al sitio de inserción del transposón (Tabla 1).

Tabla 1: Mutantes seleccionados, tipo de formación de biofilm y gen interrumpido.

Cepa	Formador de biofilm	Gen identificado
40	BAJO	Multidrug efflux protein (MFS-family transporter)
41	BAJO	phosphonoacetaldehyde hydrolase PMI3079
45	BAJO	ABC transporter permease
48	BAJO	182 bp at 5' side: antirestriction protein 26 bp at 3' side: TonB-dependent receptor
50	ALTO	Ferritin PMI1007
55	ALTO	GntR family transcriptional regulator PMI1054
60	ALTO	membrane protein PMI_RS06865
66	BAJO	Outer membrane porin PMI0765
73	ALTO	Tetrathionate reductase subunit B PMI1683
74	ALTO	Two-partner secretion system accessory protein
77	ALTO	acyl carrier protein phosphodiesterase PMI 1191
80	BAJO	Outer membrane porin PMI0765
85	BAJO	Outer membrane porin PMI0765
86	BAJO	Outer membrane porin protein C PMI_RS03760
94	BAJO	Fimbrial subunit
101	BAJO	Transporter PMI_RS05875
103	BAJO	rRNA-23S ribosomal RNA rRNA-16S ribosomal RNA

Selección de los transconjugantes por el método de cristal violeta

Luego de evaluar la presencia de una única inserción, se procedió a la evaluación de la capacidad de formar biofilms mediante la técnica de *screening* con cristal violeta. En la Fig. 3 se muestra el resultado de la cuantificación del biofilm sobre una superficie abiótica como el poliestireno.

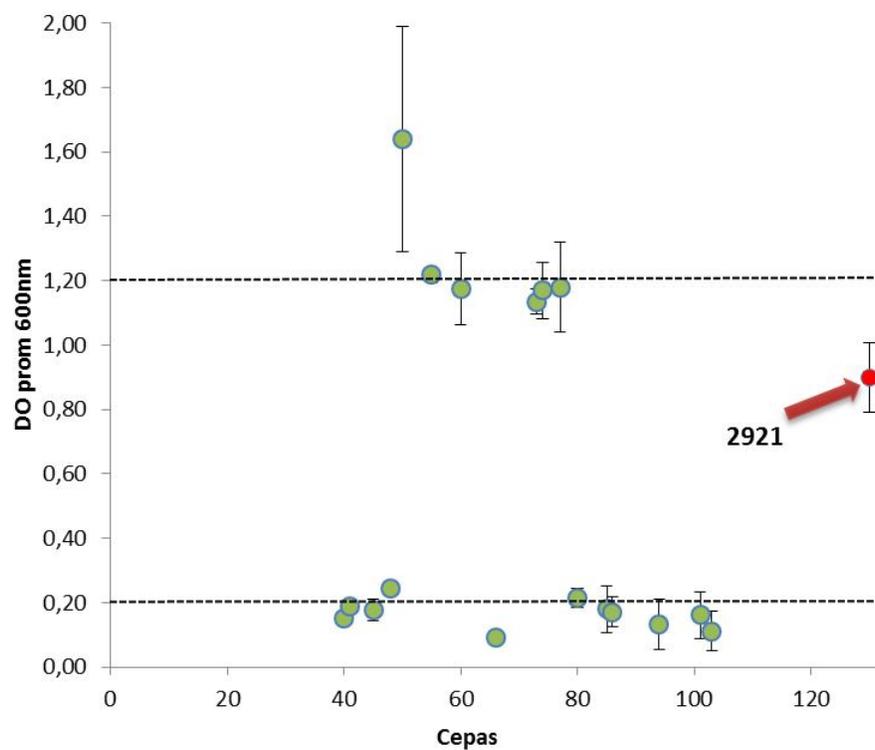


Fig. 3. Variación de las densidades ópticas de los mutantes, medido a 590nm. En rojo se muestra la DO de la cepa salvaje 2921.

En este gráfico podemos observar las diferencias de DO_{590} promedio para cada clon y destacar que se distinguen dos poblaciones. Aquellas cepas cuya DO promedio es mayor a 1,2 se consideraron cepas formadoras de alto biofilm, mientras que las cepas cuyo DO promedio se encontró por debajo de 0,2 son consideradas formadoras de bajo biofilm. Por lo tanto se clasificaron 11 cepas como formadoras de bajo biofilm y 6 de alto biofilm.

La cepa salvaje 2921 presentó un valor moderado de formación de biofilm ($DO_{590} 0,9 \pm 0,1$).

Evaluación en la capacidad de crecimiento en LB

La evaluación del crecimiento de los diferentes mutantes se llevó a cabo para verificar que la mutación adquirida no afectara el desarrollo bacteriano.

Las curvas de crecimiento bacteriano de las cepas mutantes formadoras de alto y bajo biofilm respectivamente se muestran en las Fig. 4 y 5. Se pudo constatar que todas las cepas se comportaron de manera similar en comparación con Pr2921, por lo que crecimiento no se vio afectado por la mutación.

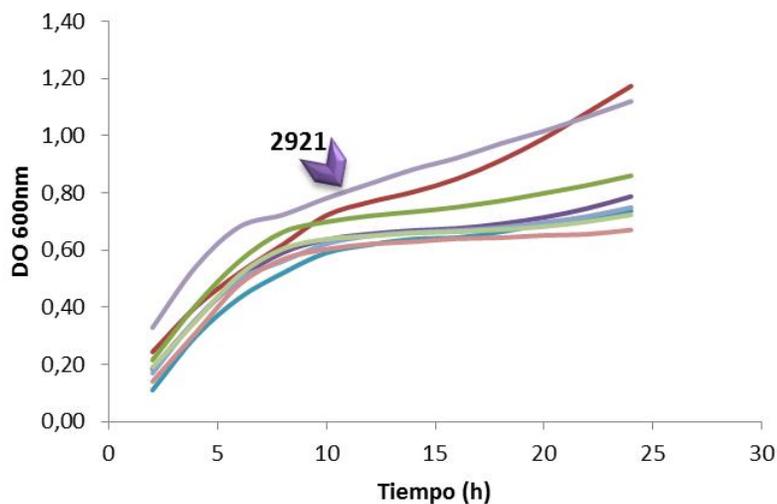


Fig.4 -Curvas de crecimientos de los mutantes formadores de alto biofilm y Pr2921 en LB a 600 nm. Los cultivos se incubaron durante 24h a 37° y se tomaron medidas cada dos horas.

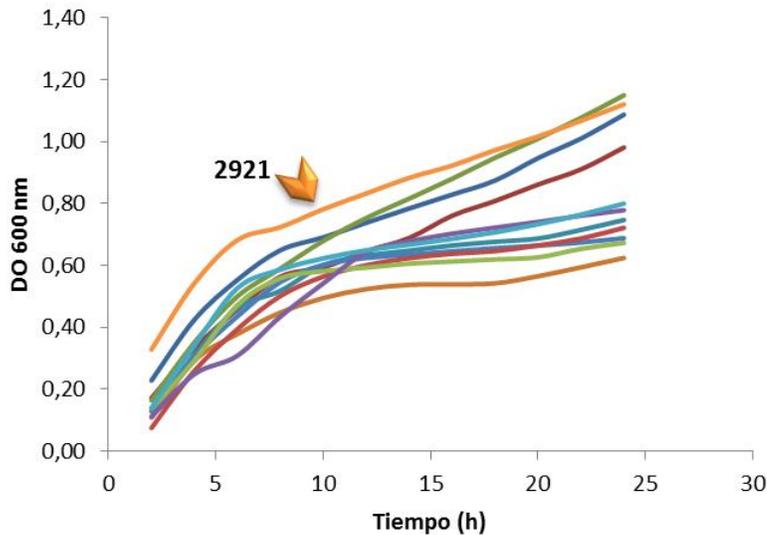


Fig. 5- Curvas de crecimiento de mutantes formadores de bajo biofilm y Pr2921 en LB a 600 nm. Las condiciones de cultivo son las mismas que se muestran en la figura anterior.

Estudio de afinidad por sustrato no polar, ensayo de hidrofobicidad

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de partición por xileno se calcularon los índices de hidrofobicidad para cada cepa, los que se muestran en las Fig. 6 y 7. Los gráficos presentan dos puntos de corte, a valores de índice igual a 20 y valores de 50. Estos valores separan poblaciones hidrofílicas de las moderadamente hidrofóbicas y altamente hidrofóbicas (Pompilio et al., 2008). Cepas con valores por debajo de índice 20 se consideraron hidrofílicas. Aquellas con valores entre 20 y 50 fueron moderadamente hidrofóbicas. Cepas con valores superiores a 50 fueron altamente hidrofóbicas. En la Fig. 6 se agrupan las cepas mutantes de alta formación de biofilm mientras que en la Fig. 7 se observan los resultados para las de baja formación de biofilm.

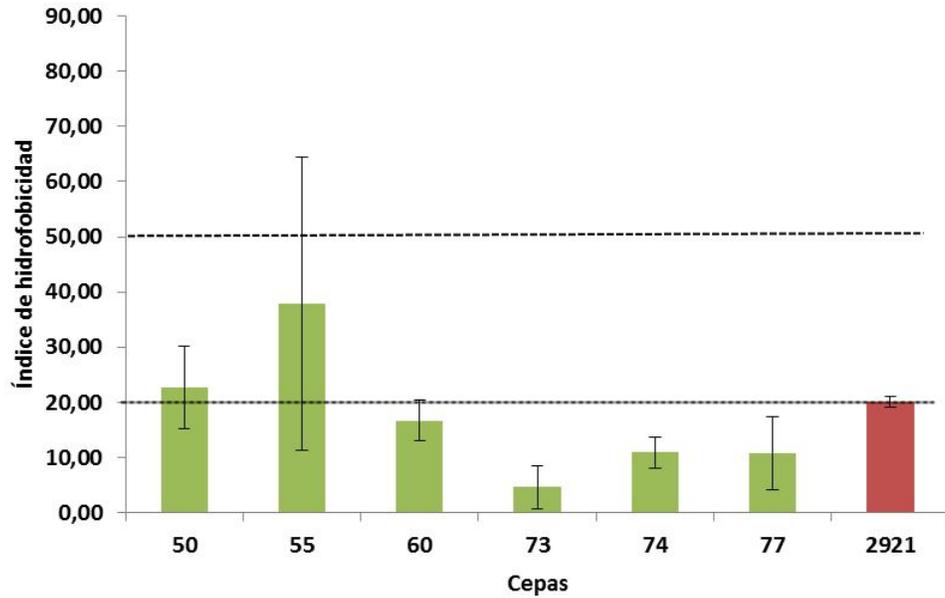


Fig.6- Valores de índice de hidrofobicidad de las cepas de alta formación de biofilm

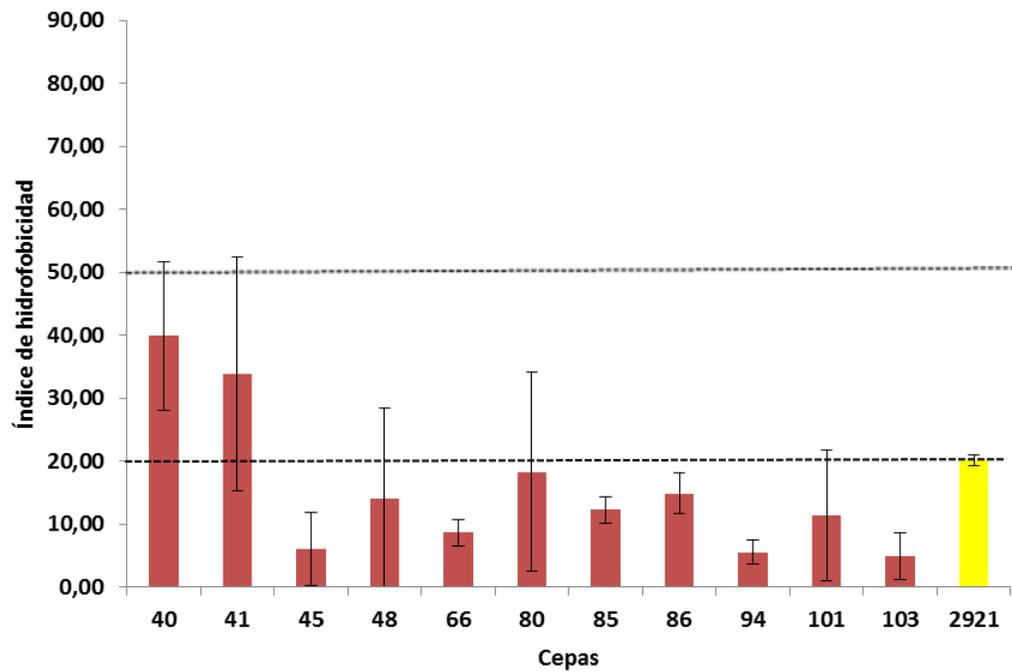


Fig.7- Valores de hidrofobicidad de las cepas de baja formación de biofilm

Los resultados obtenidos tanto en las cepas de alta formación como de baja muestra que no hay una tendencia clara entre los valores de hidrofobicidad y la capacidad de formar biofilms. Para el caso de las cepas de alta formación, 4

mostraron valores hidrofílicos de su superficie mientras que 2 resultaron tener valores moderadamente hidrofóbicos. Se observó que 9 de las 11 cepas de baja formación de biofilms mostraron tener valores de superficie hidrofílicas mientras que las restantes resultaron moderadamente hidrofóbicas.

Migración sobre catéteres

La capacidad migratoria de *P. mirabilis* subyace en el movimiento dependiente de flagelos. En la Tabla 2 se muestran los valores de migración para cada mutante en los dos tipos de catéter urinario de uso comercial empleados.

Tabla 2- Valores de migración de las cepas en catéteres de Látex y Silicona.

Clon	Cruce en látex	% cruce látex	Cruce en silicona	% cruce silicona
2921	13/15	87	14/15	93
40	14/15 (P=0,5428)	93	9/15(P=0,0309)	60
41	4/15 (P=0,009)	27	5/15(P=0,0007)	33
45	15/15 (P=0,1432)	100	15/15(P=0,3091)	100
48	15/15(P=0,1432)	100	6/15(P=0,0019)	40
50	15/15(P=0,1432)	100	10/15(P=0,0679)	66
55	8/15(P=0,0464)	53	7/15(P=0,0053)	47
60	12/15(P=0,6242)	80	11/15(P=0,1417)	73
66	8/15(P=0,0464)	53	13/15(P=0,5428)	87
73	15/15(P=0,1432)	100	4/15(P=0,0002)	27
74	12/15(P=0,6242)	80	6/15(P=0,0019)	40
77	8/15(P=0,0464)	53	4/15(P=0,0002)	27
80	14/15(P=0,5428)	93	8/15(P=0,0132)	53
85	10/15(P=0,1953)	66	2/15(P=0,0001)	13
86	15/15(P=0,1432)	100	6/15(P=0,0019)	40
94	6/15(P=0,008)	40	3/15(P=0,0001)	20
101	5/15(P=0,0029)	34	3/15(P=0,0001)	20
103	13/15(P=1)	87	0/15(P=0)	0
Significativo para valores de P≤0,05				

La significancia de los valores se calculó por medio del test de chi cuadrado. En la Tabla 2 observamos que los valores de migración son variables entre las cepas, sin embargo, podemos observar que 10 de las 17 cepas cruzan látex en similar proporción que la cepa parental 2921 no habiendo diferencias significativas entre ellas. Dentro de dicho grupo se encuentran todas las cepas de alta formación de biofilms. Cuando se empleó silicona como puente se observó una disminución de la capacidad de cruzar de las distintas cepas mutantes. Como se observa en la Tabla 2 los porcentajes de cruces son menores que en el caso de látex y se observan diferencias significativas respecto a la cepa salvaje.

Movilidad swarming

Los valores de movilidad swarming se expresaron en unidades de área de la elipse (Tabla 3). El radio de desplazamiento máximo observado fue de 4 cm que corresponde al radio de la placa de Petri.

Tabla 3- Valores de movilidad swarming de los mutantes y 2921.

Clon	Radio de desplazamiento (cm)	Área desplazada (cm²)
40	4	50,27
41	0	0,00
45	4	50,27
48	4	50,27
50	4	50,27
55	4	50,27
60	4	50,27
66	4	50,27
73	2,5	19,64
74	4	50,27
77	4	50,27
80	1,5	7,07
85	3	28,27
86	3	28,27
94	2,2	15,21
101	0,5	0,79
103	4	50,27
2921	4	50,27

Los resultados observados mostraron que once de las diecisiete cepas exhibieron una movilidad swarming que ocupa toda el área de la placa. Dentro de este grupo a excepción del clon 73 que migró 19.64cm² encontramos a todos los altos formadores de biofilm.

Además de obtener los valores de movilidad swarming para las cepas generamos registros fotográficos para observar las diferencias entre ellas porque no solo difieren en el área desplazada sino también en el patrón que generan al hacerlo (Anexo). Todas las mutantes que presentaron movilidad swarming presentaron un patrón alterado respecto a la típica movilidad de la cepa salvaje 2921.

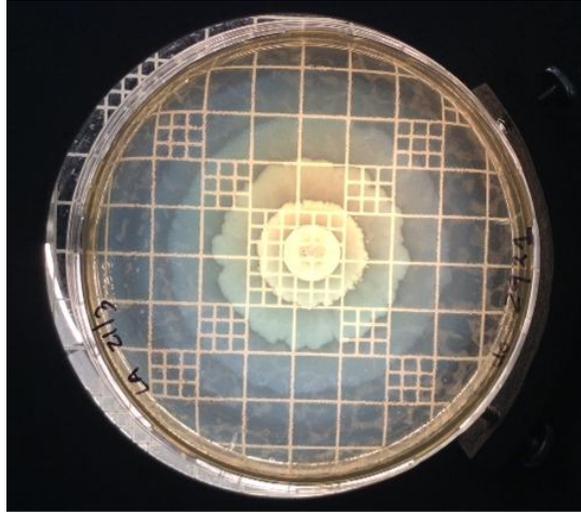
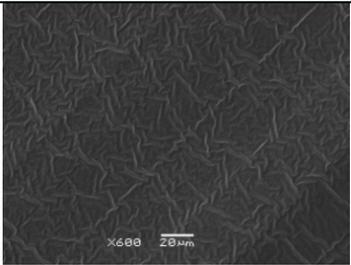
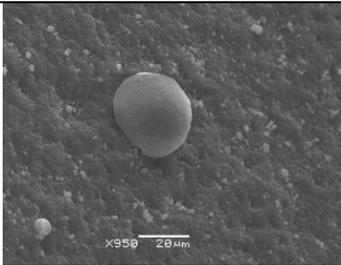
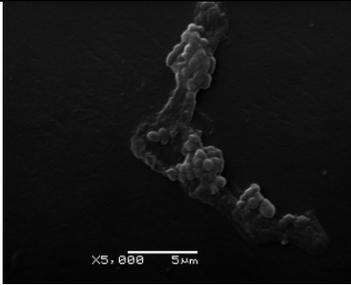
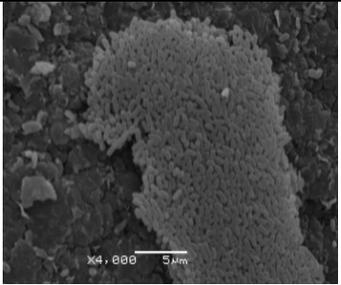
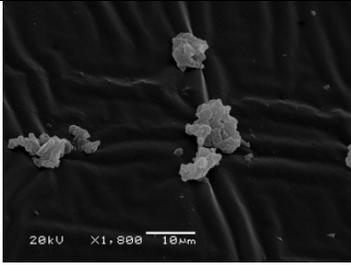
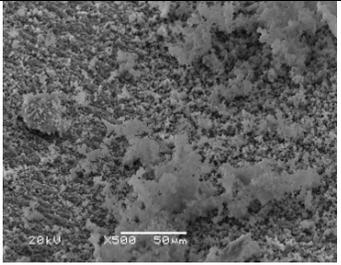
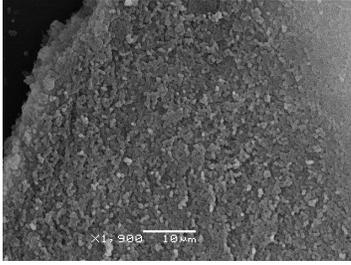


Foto de movilidad swarming de la cepa parental Pr 2921

Microscopía electrónica de barrido

De las cepas que cruzaron catéteres se seleccionaron una perteneciente al grupo de alta formación de biofilm y otra del de baja para su análisis mediante MEB y observar las características de la superficie celular y la formación de biofilm.

Tabla 4 – Fotos obtenidas por MEB de las distintas cepas en látex y silicona

CEPA	SILICONA	LÁTEX
Control		
40		
55		
2921		

En las imágenes superiores se observa los dos materiales de los catéteres (control sin bacterias). Las imágenes siguientes corresponden al clon 40 que es de baja formación de biofilm, al clon 55 que es de alta formación y a la cepa salvaje 2921.

Las micrografías de las secciones estériles de silicona y látex mostraron las diferencias inherentes de cada material. Para el caso de la silicona observamos una estructura altamente ordenada y poco rugosa. En el caso del látex la estructura es muy rugosa y no homogénea, se puede apreciar una esfera en el centro de la imagen compuesta de zinc al 12%, materiales muy utilizados en forma de óxidos para el látex sintético (Análisis de EDS, Fac. Ciencias).

Para el caso del clon 40 las micrografías mostraron los aumentos X5000 en silicona y X4000 en látex y las escalas en ambas fue de 5µm. El Clon 55 tuvo aumentos X1800 en silicona y X50 en látex, las escalas midieron 10 µm y 50 µm respectivamente. Si bien las micrografías de los clones tuvieron distintos aumentos, la tendencia fue igual para ambos. Las cepas 40 y 55 en látex mostraron una gran población celular y muy próximas escenario similar al observado con la cepa salvaje 2921. El clon 40 mostró un único gran cúmulo de células bacilares bien definidas mientras que para la cepa 55 la población era tan grande que abarca toda la sección por completo, se apreciaron varios acúmulos bacterianos y dado el elevado número no se observaron células individuales. En silicona, las cepas 40 y 55 mostraron un número muy reducido de bacterias en comparación al látex. Se pudo ver en ambos casos pequeños cúmulos de pocas células recubiertas por una sustancia de apariencia gelatinosa (probablemente EPS). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el cruce de catéteres en donde la cepa salvaje 2921 cruza y forma biofilms en ambos materiales. La cepa 40 cruza más fácilmente látex que silicona y la 55 cruza ambos materiales en igual proporción. Estos resultados se pueden explicar en parte por la composición diferencial de los materiales dado que una cepa de baja formación de biofilm es igual capaz de cruzar látex.

Discusión

Los biofilms son comunidades de microorganismos adheridos entre sí y a superficies variadas de forma irreversible, embebidos en una matriz polimérica extracelular de producción propia que exhiben un fenotipo particular en relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes (Donlan & Costerton, 2002). Los biofilms son relevantes en diversos contextos, en particular en el ámbito médico y clínico donde se asocian a algunos tipos de infecciones crónicas y a aquellas causadas por implantes médicos (Costerton *et al.*, 1999).

Entre los implantes médicos más comúnmente usados se ubican los catéteres urinarios (Darouiche, 2001). La relevancia clínica del uso de catéteres se manifiesta en el desarrollo de infecciones urinarias, que afectan muy frecuentemente a pacientes que se encuentran bajo cateterización prolongada. Estas infecciones están asociadas a la formación de biofilms en la superficie de los catéteres (Trautner & Darouiche, 2004) y representan al menos el 40% de las infecciones totales en los hospitales. (Kaye & Hesse 1994).

La formación de un biofilm es un proceso secuencial y muy regulado que comprende varias etapas diferenciadas en las cuales están implicados diversos factores bacterianos (Costerton *et al.*, 2003; Davey & O'Toole, 2000). Las diferentes etapas son: aproximación y adhesión inicial reversible, adhesión robusta irreversible y producción de EPS, formación de microcolonias, maduración y dispersión (Donlan & Costerton 2002).

P. mirabilis es uno de los microorganismos que podemos encontrar en mayor proporción en pacientes con infecciones urinarias asociadas a catéteres (Mobley *et al* 1996). Este agente da lugar a biofilms cristalinos que pueden obstruir el lumen del catéter y generar serias complicaciones como pielonefritis y septicemia (Stickler, 2008).

El objetivo propuesto en este trabajo fue caracterizar fenotípicamente mutantes de *Proteus mirabilis* defectivas en la formación de biofilms.

Para esto nos planteamos una serie de objetivos específicos que nos permitieran dilucidar los aspectos involucrados.

Selección de cepas mutantes de P. mirabilis con alteraciones en la formación de biofilms.

Para el estudio de estas comunidades la utilización de cepas mutantes ha sido una estrategia muy importante que ha permitido determinar los factores asociados a su formación. Las herramientas utilizadas nos permiten conocer funciones de genes, así como rutas metabólicas implicadas en el proceso.

Se partió de una colección de cepas mutantes generadas por nuestro laboratorio (Dpto de Microbiología del IIBCE) por conjugación de una cepa parental, Pr2921 obtenida de un paciente con ITU sintomática (Zunino et al., 2000), con una cepa donadora de *E. coli* portadora de un plásmido p-BAM1.

El plásmido pBAM1 cuenta con 4384 pares de bases y su replicación depende de la proteína π , codificada por el gen *pir*, ausente en *P. mirabilis*. pBAM1 incluye un mini transposón derivado de Tn5, flanqueado por elementos mosaico (ME, del Inglés: *Mosaic Element*) de 19 pares de bases, denominadas ME-I y ME-O. Entre las mismas, se sitúa un gen de resistencia a kanamicina (Km^R) que se utiliza como marcador de selección, y un sitio de clonado múltiple (MCS, del Inglés: *Multiple Cloning Site*) con 15 sitios de corte para enzimas de restricción. También posee el gen de la transposasa *tnpA* que cataliza la inserción aleatoria del módulo móvil en el genoma, y el gen *bla* que codifica para una β -lactamasa, otorgando resistencia a ampicilina (Martínez-García et al. 2011). Trabajos previos realizados en nuestro Departamento mostraron que el sistema p-BAM es efectivo para la generación de mutantes al azar, obteniéndose 6.3% de mutantes (Iribarnegaray, V. 2014). Si bien otros autores han obtenido resultados mayores, se debe considerar que la capacidad de mutagénesis en *P. mirabilis* es baja (Belas et al., 1991).

Previamente se verificó una única inserción del plásmido por Southern Blot ya que nos interesaba ver el aporte de un solo gen interrumpido. El método de screening empleado fue mediante la técnica de tinción con cristal violeta. Este es un método que permite evaluar de forma rápida la formación de biofilms sobre superficies abióticas. Presenta la desventaja de no ser un método adecuado para estudiar el efecto de un antimicrobiano sobre los biofilms dado

que el cristal violeta tiñe además de las células vivas, las muertas y la matriz de exopolisacárido (Pantarella et al., 2013) sin embargo tiene las ventajas de ser un método semicuantitativo y rápido por ello es un método muy utilizado en estos días.

En el presente trabajo utilizamos este método para tamizar las cepas mutantes, lo que permitió separar poblaciones de alta formación de biofilm de las baja formación de biofilm, considerando altas a aquellas que tuvieron una DO_{590} promedio $>1,20$ y bajas a las que tuvieron DO_{600} promedio $<0,20$ (Villegas et al., 2013).

Estudio de la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas mutantes en medios de cultivo clásicos.

El sistema de transcojugación empleado genera mutaciones al azar. Con el fin de evaluar que la mutación no afectara la capacidad de crecimiento de las cepas, se realizó una curva de crecimiento para cada mutante y se la comparó con el crecimiento de la cepa parental Pr2921. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento similar de todas las cepas mutantes respecto a Pr 2921. Se ha observado que variando el medio de cultivo por ejemplo empleando orina artificial, se obtienen curvas de crecimiento diferentes a las observadas en medio LB. Sin embargo no se observan diferencias entre la cepa parental y mutantes lo que establece que las diferencias se deban a la composición del medio, siendo la orina artificial un medio pobre en nutrientes (Baraibar, V. 2012). Por lo tanto podemos asentar que la capacidad de crecimiento de los distintos mutantes tiene una tendencia similar a la parental y que no se encuentra afectada.

Determinación de la capacidad de adhesión a superficies abióticas.

La hidrofobicidad celular potencia la afinidad bacteriana por sustratos no polares como son las superficies plásticas e influye en la adhesión bacteriana. Para determinar la adhesión a superficies abióticas fue empleada la técnica de partición por Xileno (Bibloni et al 2001). El Xileno o Xilol es un derivado dimetilado del benceno utilizado en esta técnica como fase orgánica, donde

aquellas cepas bacterianas más hidrofóbicas tienden a permanecer. La técnica mide qué tan hidrofóbica o hidrofílica es una cepa de acuerdo a su distribución entre la fase orgánica y la fase acuosa, llamando a esta medida Índice de hidrofobicidad. Trabajos previos como el de Pompilio et al., 2008 introduce puntos de corte en los valores de hidrofobicidad para separar poblaciones hidrofílicas, moderadamente hidrofóbicas de altamente hidrofóbicas.

Se analizaron separadamente las cepas de alta formación de biofilms y las de baja formación. Para el caso de las cepas de alta formación el 66 % mostró valores hidrofílicos y el restante moderadamente hidrofóbica. Este comportamiento también se observó para el caso de las cepas de baja formación en donde el 80% presentó valores hidrofílicos y las demás moderadamente hidrofóbicas. Sería de esperar que cepas con valores de índice de hidrofobicidad bajo tuvieran una tendencia a tener una superficie bacteriana hidrofílica. Esto sucede con las cepas de baja formación, pero también con las de alta formación. Es posible encontrar microorganismos que posean capacidades similares de formar biofilms pero presenten diferencias en la hidrofobicidad, como reportó Pompilio y colaboradores estudiando *S. maltophilia*. Los resultados obtenidos coincidirían con lo observado en dicho trabajo pues la formación de biofilms estaría regulada por diferentes factores, siendo la hidrofobicidad uno de ellos.

Se considera como regla general que la adhesión aumenta o disminuye de acuerdo al incremento o disminución en la hidrofobicidad respectivamente (Van Loosdrecht et al 1987), diversos trabajos han mostrado resultados contradictorios. Jacobs & Chenia (2011) mostraron que *Elizabethkingia meningoseptica* siendo muy hidrofílica presentó una adherencia elevada. Por lo tanto, cepas de alta como baja formación de biofilms tienen una tendencia a presentar su superficie más hidrofílica. Cabe destacar que el ensayo de hidrofobicidad se realizó sobre un cultivo de bacterias planctónicas. Se ha reportado que los valores de hidrofobicidad pueden variar al realizarlo sobre el biofilms (Pompilio et al.,2008).

Estudio de la capacidad de migrar sobre secciones de catéteres de uso clínico de distinto material.

Como se describió previamente *P. mirabilis* tiene la capacidad de cambiar de forma, puede pasar de una célula corta *swimmer* a una multinucleada y elongada con múltiples flagelos o célula *swarmer* (Tan & Gajra, 2006). La movilidad *swarming* se describe como el movimiento de la célula dependiente de flagelos sobre una superficie. Esto le permite a *P. mirabilis* una vez que se transforma en célula *swarmer* a migrar sobre las superficies de catéteres y entrar al tracto urinario (Jacobsen et al., 2008, Sabbuba & Stickler 2002, Stickler & Hughes 1999). Para este estudio utilizamos látex y silicona, dos materiales de catéteres urinarios de uso cotidiano en la clínica y evaluamos la capacidad de *P. mirabilis* de cruzar puentes de 1cm de cada material luego de 24 hs de incubación. Los resultados obtenidos mostraron que en la mayoría de los casos los mutantes cruzaron con menos dificultad por los catéteres de látex que por los de silicona, que lo hicieron en forma similar a la cepa parental y que dentro de este grupo se encontraron todas las cepas de alta formación de biofilm. Resultados previos obtenidos en el Depto de Microbiología coinciden con estos resultados y con los obtenidos por otros autores (Jones et al., 2004; Stickler & Hughes, 1999, Schlapp, 2009).

Es importante destacar que el clon 94 exhibió una muy disminuída capacidad de migración. Es interesante notar que la mutación en este clon afectó una subunidad fimbrial lo que disminuyó significativamente su capacidad de migrar. En el clon 41 también se observó una disminución considerable en la capacidad de migración. Este clon posee la mutación en la enzima fosfonoacetaldehído hidrolasa por lo que tiene afectada su capacidad de obtener fosfonatos como fuente de energía (Huang et al., 2005) Si bien no desaparece por completo la migración y la cepa crece de forma similar a la parental, inferimos que la mutación en este caso genera disminución de la migración pero no hay supresión de la misma. En el caso del clon 101 cuyo gen mutado es un transportador también se observó una disminución notoria en la capacidad de migrar. Sin embargo la capacidad de formación de biofilms sobre

la superficie de los catéteres según Jones et al., 2005 no tiene que ver con los fenómenos de movilidad en distintos mutantes swarmer o swimming. Trabajos comparativos entre cultivos con LB y orina artificial sugirieron que las células *swarmer* podrían tener un rol en la captación de nutrientes ya que su extensión hace que tengan mayor disponibilidad y que podrían estar implicadas en la disociación del biofilm, las cuales podrían desprenderse del mismo y buscar nuevas áreas para la colonización, ricas en nutrientes (Jones et al., 2007).

Evaluación de la movilidad swarming de las distintas cepas mutantes.

En el ítem anterior como en este referimos a la capacidad de *P. mirabilis* de recorrer superficies sólidas. Aquí evaluamos la movilidad swarming sobre una placa de Pretri con LB agar. Como describen Latta et al., 1999 y Jones et al., 2004 el patrón típico de *P. mirabilis* en una superficie sólida se debe a rondas secuenciales de diferenciación a células swarmer, migración de las colonias y consolidación con las células swimmer. Esos trayectos se repiten varias veces y los flagelos entre células swarmer adyacentes se conectan de forma helicoidal. Los resultados que obtuvimos para esta movilidad tienen una tendencia similar al caso anterior. La mayoría de los casos tiende a moverse y extenderse en toda el área de la placa como lo hace la cepa parental. Los clones 41, 94 y 101 tienen movilidad defectuosa.

Análisis de las propiedades de la superficie bacteriana.

Diversos factores contribuyen a la formación de biofilm en *P. mirabilis*. Al observar las propiedades de la superficie bacteriana por microscopía de barrido (MEB) referimos a aquellas visibles como múltiples fimbrias, observación EPS, flagelo o células más elongadas. Se analizaron superficies de secciones de catéteres de látex y silicona que fueron cruzados por una cepa de alta formación de biofilm (el clon 55) y una de baja formación (clon 40). Los resultados de cruces sobre catéteres mostraron la tendencia general de cruzar menos sobre superficies de silicona que de látex. Si observamos las imágenes obtenidas se encuentra que para ese material las microcolonias formadas son

de pocas células lo que podría significar que migrarían menos sobre la superficie. Considerando además el análisis de la superficie de los materiales podemos afirmar que el látex es una superficie propicia a ser colonizada y formar biofilms. Es conocida la naturaleza irregular de la superficie del látex mientras que la silicona presenta una superficie más suave y con menos irregularidades (Stickler et al., 2003) como se ha confirmado en el presente trabajo.

Conclusiones y perspectivas

Podemos inferir que la formación de biofilms de *P. mirabilis* es un fenómeno complejo que involucra diversos genes, estos influyen en las propiedades de la superficie bacteriana y en la capacidad de migrar sobre distintos materiales.

La naturaleza de la superficie abiótica también debe considerarse al momento de estudiar las propiedades fenotípicas en la formación de biofilms.

Como perspectivas se plantea continuar con la evaluación de la hidrofobicidad pero sobre el biofilm directamente. Se estudiará si las cepas mutantes defectivas en la formación de biofilms son infectivas en un modelo murino de infección urinaria ascendente. De esta forma se establecerá si hay una correlación entre la formación de biofilms y la ITU experimental.

Cabe mencionar que el presente estudio se realizó desarrollando el biofilm en condiciones estáticas por lo que el estudio en condiciones de flujo permitirá evaluar otros aspectos del desarrollo y estabilidad del biofilm, así como tener una aproximación a la situación real de flujo que se observa en pacientes cateterizados.

Referencias

- Adal** K. A. & Farr B. M. (1996). Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition* 12:208-13.
- Allison** C, Emödy L, Coleman N, Hughes C. (1994) The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *J Infect Dis* 169:1155-1158.
- Archibald** L. K. & Gaynes R. P. (1997). Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. *Nosocom Infect.* 11:245-55.
- Baraibar** V. (2012). Rol de fimbrias y flagelos en la formación y desarrollo de biofilms de *Proteus mirabilis*. Tesina de grado Lic. Bioquímica Udelar.
- Belas** R. (1992). The swarming phenomenon of *Proteus mirabilis*. *ASM News* 58:15-22.
- Belas** R. (1996) *Proteus mirabilis* swarmer cell differentiation and urinary tract infection. *En* Mobley HL & Warren J (eds.), *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press, Washington DC.
- Belas** R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol.* 22:517-527.
- Bibloni** R, Pérez PF, Garrote GL, Disalvo EA, De Antoni GL.I. (2001) Surface characterization and adhesive properties of Bifidobacteria. *En* *Methods in Enzymology. Microbial growth in biofilms part. A* (ed.) Doyle, R.J. New York: Academic Press. *Clin Invest* 112:1466-
- Breitenbach** J. M. & Hausinger R. P., (1988). *Proteus mirabilis* urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids. *Biochem. J.* 250:917-20.
- Carpentier** B & Cerf O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75:499-511.
- Cassel** EJ. (1991). The importance of understanding suffering for clinical ethics. *J Clin Ethics.* 2:81-82.
- Corpe** W. A., (1980). Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. *En* Bitton G., Marshall K. C., editores. *Adsorption of microorganisms to surfaces*. New York: John Wiley & Sons. p 105-144.
- Costerton** JW, Geesey GG, Cheng KJ. (1978) How bacteria stick. *Sci Am.* 238:86-95
- Costerton** J. W., Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:318-22.
- Costerton** W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. (2003) The application of Biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 117:1466-77.

Darouiche RO. (2001) Device-associated infections: a macro problem that starts with micro adherence. *Clin Infect Dis.* 33:1567-72.

Davey M.E.& O'Toole G. A., (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 64:847-67.

Dickinson M. & Bisno A. L., (1993). Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. *Int. J. Artif.Organs* 16:749-54.

Donlan R. M. & Costerton J. W., (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin.Microbiol.Rev.* 15: 167-93.

Donlan RM. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8:881-890.

Duguid JP, Smith IW, Dempser G, Edmunds PN.(1955). Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol.* Oct;70:335-48.

Dunne WM. (2002). Bacterial adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *ClinMicrobiol. Rev.*15:155-166.

Foxman B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economics costs. *Dis. Mon.* 49:53-70.

Fuqua CW, Winans SC, Grennberg EP. (1994). MINIREVIEW Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulatorst. *J Bacteriol.*176: 269–275.

Griffith DP, Musher DM, Itin C.(1976). Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. *Investig. Urol.* 13:346-50

Guay DR.(2008).Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs.* 68:1169-1205.

Hartstein Al, Garber SB, Ward TT, Jones SR, Morthland VH. (1981). Nosocomial urinary tract infection: a prospective evaluation of 108 catheterized patients. *Infect. Control* 2:380-86.

Hooton TM, Bradley SF; Cardenas DD; Colgan R; Geerlings SE; Rice JC; Nicolle LE. (2010). Diagnosis, Prevention and Treatment of Catheter- Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 Intrenational Clinical Prectice Guidelines from the infectious Diseases Society of America. *ClinInfec Dis.* 50:625-663.

Hoyle B. D. et al., (1992).*Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob.Agents Chemother.* 36:2054-56.

Huang J., Su Z., Xu Y. (2005). The evolution of microbial phosphonate degradative pathways. *J Mol Evol.* 61:682-90.

Hunter, P. (2008) The mob response. The importance of biofilm research for combating chronic diseases and tackling contamination. *EMBO Rep.* 9:4:314-317.

Iribarnegaray V. (2014). Evaluación de mutantes defectivas en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis*. Tesina Lic. Ciencias Biológicas, Udelar.

Jacobs A. & Chenia H. Y., 2011. Biofilm formation and adherence characteristics of an *Elizabethkingia meningoseptica* isolate from *Oreochromis mossambicus*. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 10:16.

Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirliff ME.(2008).Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*.Cn.Microbiol.Rev. 21:26-59.

Jarvis W. R., (1996). Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 17:552-57.

Jones B. D. & Mobley H. L., (1987).Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. Infect. Immun. 55:2198-2203.

Jones BV, Mahenthiralingam E, Sabbuba NA, Stickler DJ. (2005) Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. J Med Microbiol. 54:807-813.

Jones BV, Young R, Mahenthiralingam E, Stickler DJ. (2004) Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. Infec Immun. 72:3941-3950.

Jones S, Yerly J, Hu Y, Ceri H, Martinuzzi R. (2007) Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial and standard laboratory media. FEMS Microbiol Lett. 268:16-21.

Joo HS & Otto M.(2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens.Chem Biol.19:1503-13.

Kaye & Hessen, 1994. Infections associated with foreign objects in the urinary tract, p. 291-307. *En* Bisno, A.L. & Waldovogel, A. (ed.), Infections associated with indwelling medical devices, 2nd. ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Kaye, D. & Hessen, M.T.(1994). Infections associated with foreign bodies in the urinary tract. American Society for Microbiology, p.291-307

Kunin C. M., (1987). Detection, prevention and management of urinary tract infections, 4th edition, p. 245-88.Lea &Febiger, Philadelphia, Pa.

Lazzar V. (2011). Quorum sensing in biofilms. How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? Anaerobe. 17:280-285.

Legnani-Fajardo, C., Zunino, P., Piccini, C., Allen, A., Maskell, D.. (1996) Defined mutants of *Proteus mirabilis* lacking flagella cause ascending urinary tract infection in mice. Microb Pathog. 21:395-405.

McLean RJ, Whiteley M, Stickler DJ, Fuqua WC.(1997).Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms.FEMS MicrobiolLett. 154:259-263.

Mobley HL &Belas R.(1995) Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract.Trends Microbiol. 3:280-284.

Mobley HL. (1996) Virulence of *Proteus mirabilis*. En Mobley HL & Warren J. (eds) Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management. ASM Press, Washington DC.

Musher D.M. et al.,(1975). Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with *Proteus*. J. Infect. Dis. 131:177-81.

Nadell CD; Xavier JB; Foster KR. (2008). Sociobiology of biofilms. FEMS Microbiol. 33:206-224.

Nicolle LE.(2005). Complicated urinary tract infection in adults. Can J Infect Dis Med Microbiol. 16:349-36.

Nielubowicz GR, & Mobley HLT. (2010). Host-patogen interactions in urinary tract infection. Nature Rev Urology. 78:430-441.

Niel-Weise & van der Broek, (2005). Urinary catheter policies for long term bladder drainage. Cochrane Database Syst. Rev. 2005:CD004201.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 54:49-79.

Pearson MM, Sebahia M, Churcher C, Quail MA, Seshasayee AS, Luscombe NM, Abdellah Z, Arrowsmith C, Atkin B, Chillingworth T, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabinowitsch E, Walker D, Whithead S, Thomson NR, Rather PN, Parkhill J, Mobley HL. (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. J Bacteriol 190:4027-37

Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, D'Antonio D, Savini V, Di Bonaventura G.(2008). Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. FEMS Microbiol Lett. ;287:41-7.

Pratt LA & Kolter, R.(1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol, 30, 285–93.

Pratt LA & Kolter R. (1999) Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Current Opinion Microbiol. 2:598-603.

Rather P. N., (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. Environ. Microbiol. 7:1065-73.

Rosenberg & Kjelleberg.(1986). Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. Advances in Microbial Ecology. 9:353-93.

Rózalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K. (1997) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. Mol Biol Rev. 61:65-89.

Sabbuba N, Hughes G, Stickler DJ. (2002). The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. BJU int. 89:45-60.

Schlapp G, Scavone P, Zunino P, Härtel S. (2011). Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. J Microbiol Methods. 87:234-240.

- Senior** BW. (1979). The special affinity of particular types of *Proteus mirabilis* for the urinary tract. J Med Microbiol. 12:1-8.
- Stamm** W. E., (1991). Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. Am. J. Med. 91:65S-71S.
- Stanley** NR & Lazizzera BA.(2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Mol Microbiol. 52:917-924.
- Stickler** & Zimakoff, (1994). Complications of urinary tract infections associated with devices used for long term bladder management. J. Hosp. Infect. 28:177-94.
- Stickler** D. J., (1996). Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. Biofouling 94:293-305.
- Stickler** DJ & Hughes G.(1999). Ability of *Proteus mirabilis* to swarm over urethral catheters. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18:206-8.
- Stickler** DJ (2014). Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. J Intern Med 2014; 276: 120–129.
- Stickler** DJ, King JB, Winters C, Morris SL. (1993) Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. J Infect. 27:133-135.
- Stickler** DJ., Lear JC., Morris NS., Macleod SM, Downer A., Cadd DH., Feast WJ.(2006). Observations on the adherence of *Proteus mirabilis* onto polymer surfaces. J. Appl. Microbiol. 100:1028-33.
- Stodley** P, Hall- Stodley L, Costerton B, Demeo P; Shirliff M, Gawalt E, Kathju S. (2013). Biofilms, Biomaterials, and Device-Related Infections. App Med and Medical Devices.77-102.
- Tan** IK, Gajra B, Lim MS.(2006). External proficiency testing programmes in laboratory diagnoses of inherited metabolic disorders. Ann Acad Med Singapore. 35(10):688-93.
- Trautner** BW & Darouiche RO. (2004) Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. Am J Infect Control 32:177-183.
- Tuja** A. (APIPE 2014). Identificación de genes involucrados en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis*.
- Villegas** N, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, Becerra M, Padola N, Paraje M. (2013). Relevance of Biofilms in the Pathogenesis of Shiga-Toxin-Producing Escherichia coli Infection. The Scientific World Journal. 2013:1-7
- Warren** J. W., (1997). Catheter-associated urinary tract infections. Infect. Dis. Clin. N. Am. 11:609-22.
- Warren** J.W., Steinberg L, Hebel JR, Tenney JH. (1989). The prevalence of urethral catheterization in Maryland nursing homes. Arch Intern Med. 149:1535-1537.
- Warren** JW, Tenney JH, Hoopes JM, Muncie HJ, Anthony WC.(1982) A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. J Infect Dis. 146:719-723.

Williams F. D. & Schwarzhoff R. H., (1978). Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 32:101-22.

Zunino P, Piccini C, Legnani-Fajardo C. (1994) Flagellate and non-flagellate *Proteus mirabilis* in the development of experimental urinary tract infection. *Microb Pathog.* 16:379-385.

Zunino P, Geymonat L, Allen AG, Legnani-Fajardo C, Maskell DJ. (2000). Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 29:137-43.

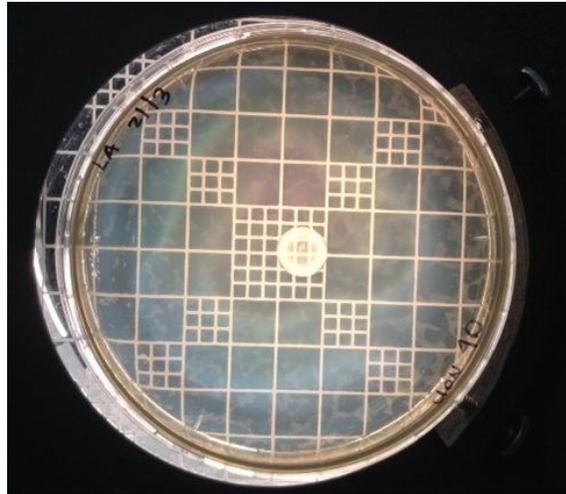
Zunino P, Geymonat L, Allen AG, Preston A, Sosa V, Maskell DJ. (2001) New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 31:113-120.

Zunino P, Sosa V, Allen AG, Preston A, Schlapp G, Maskell DJ. (2003). *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. *Microbiology* . 149:3231-3237.

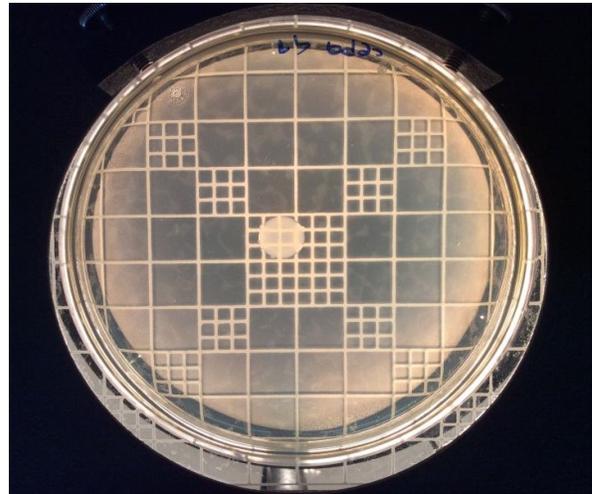
Anexo

Fotografías de *swarming*

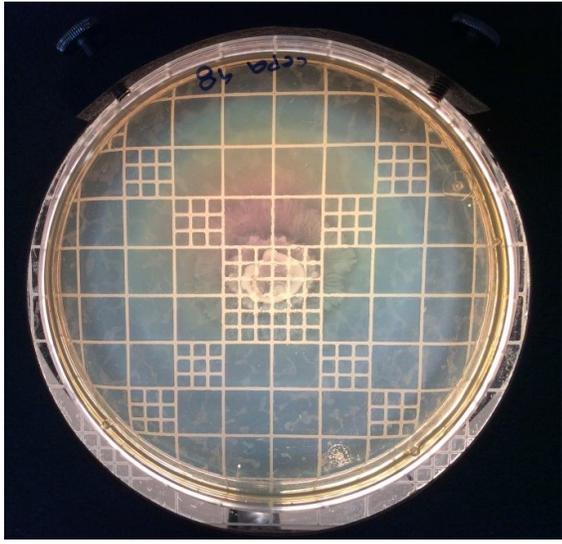
A continuación se muestran los patrones de migración de los distintos mutantes seleccionados. Se detalla el número de clon al costado de cada imagen.



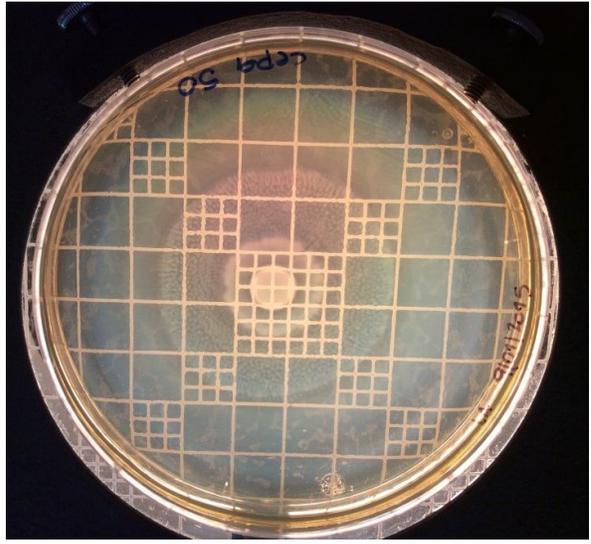
40



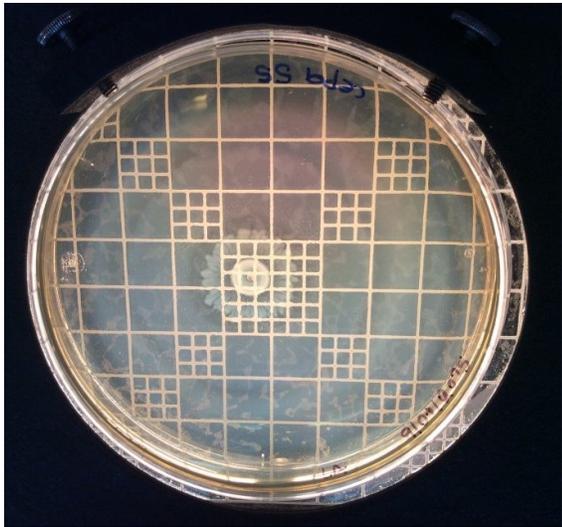
41



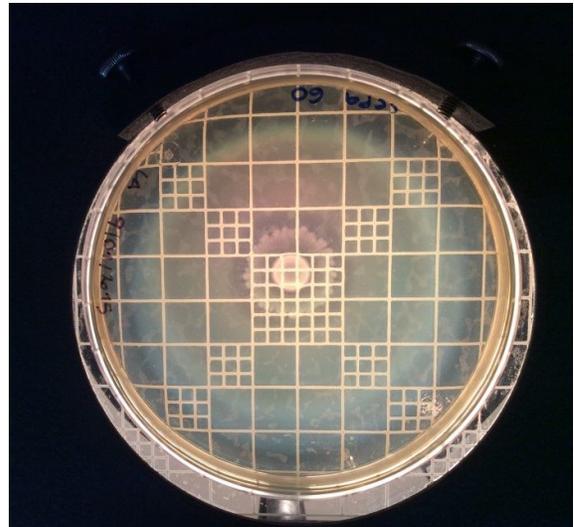
48



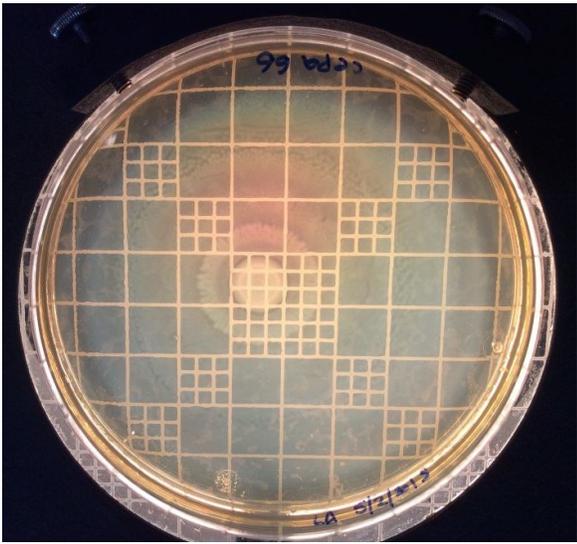
50



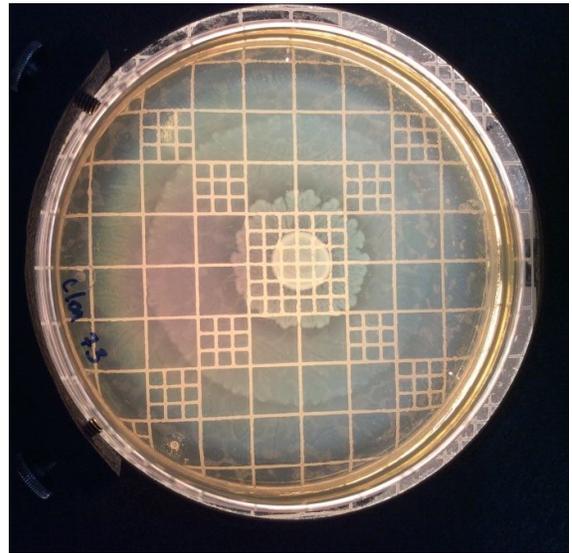
55



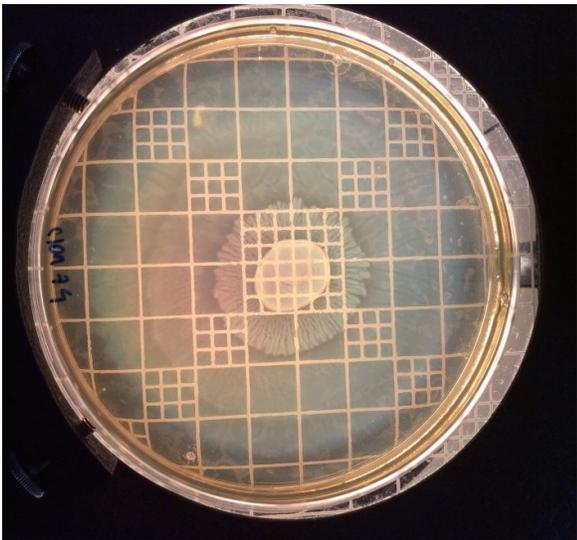
60



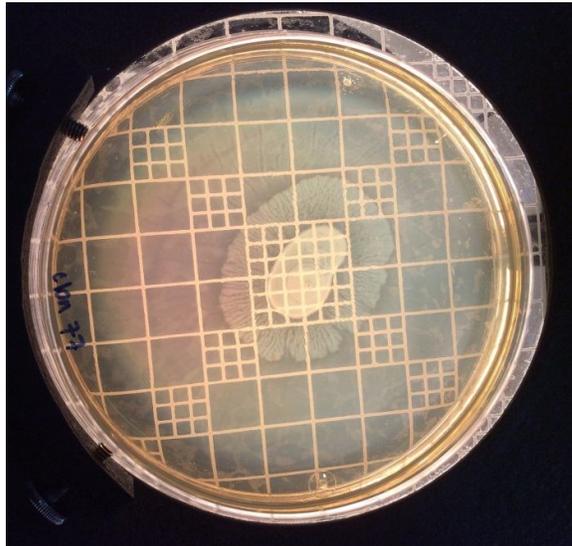
66



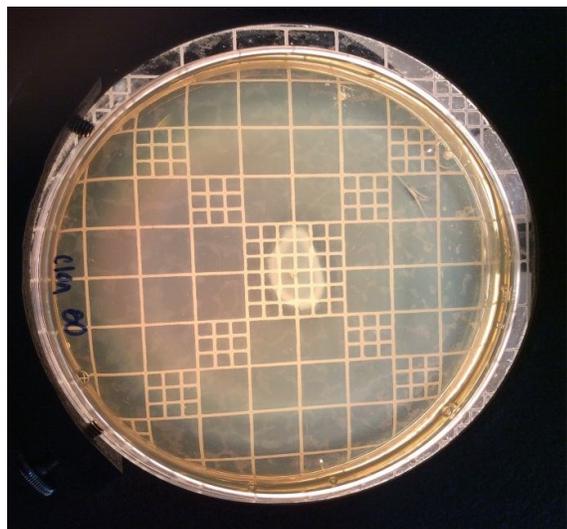
73



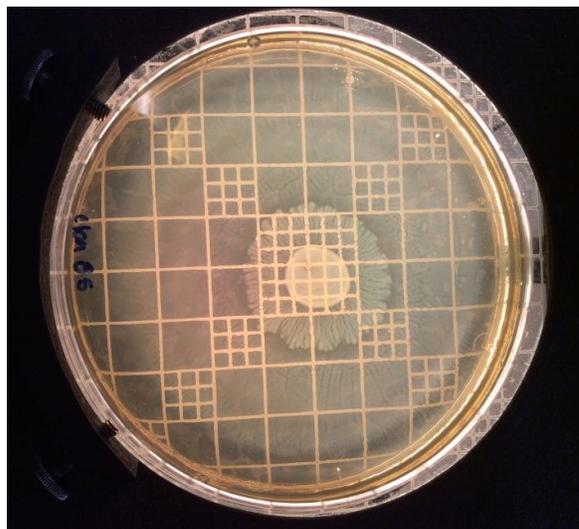
74



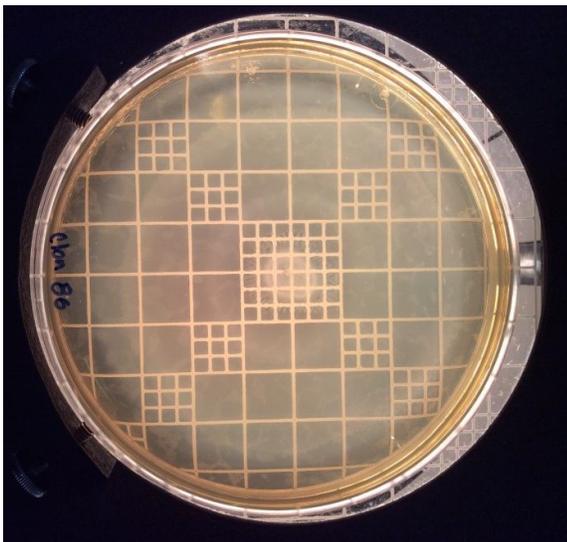
77



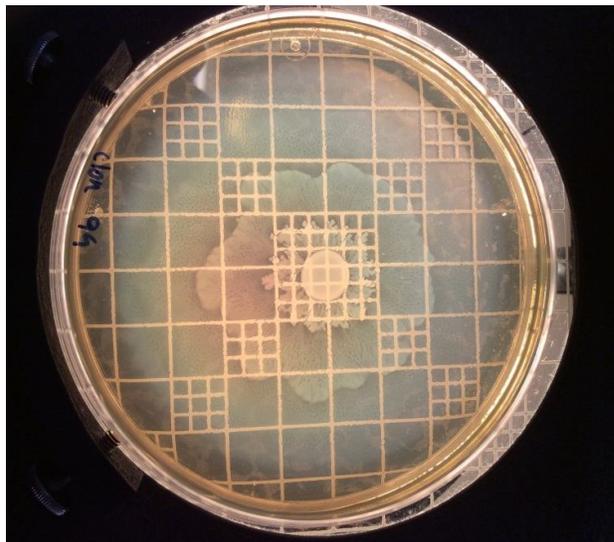
80



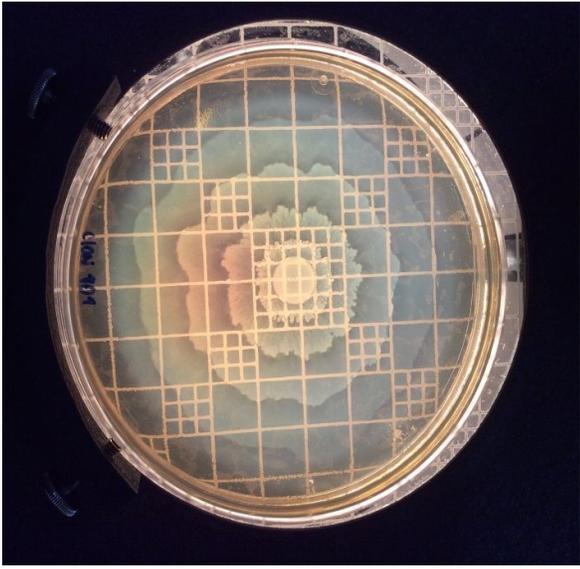
85



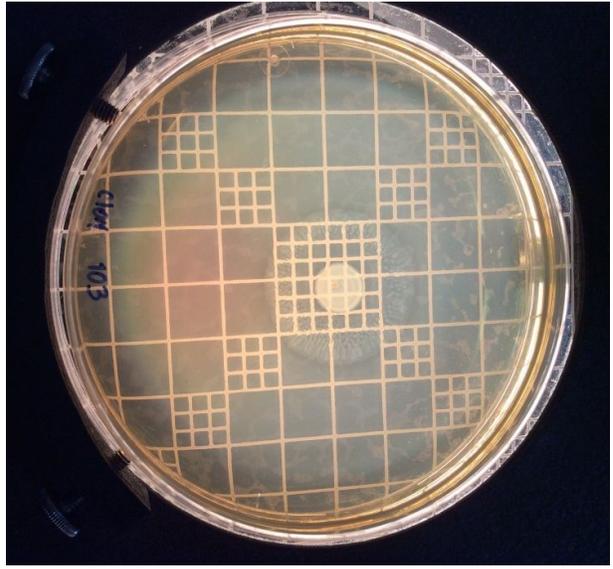
86



94

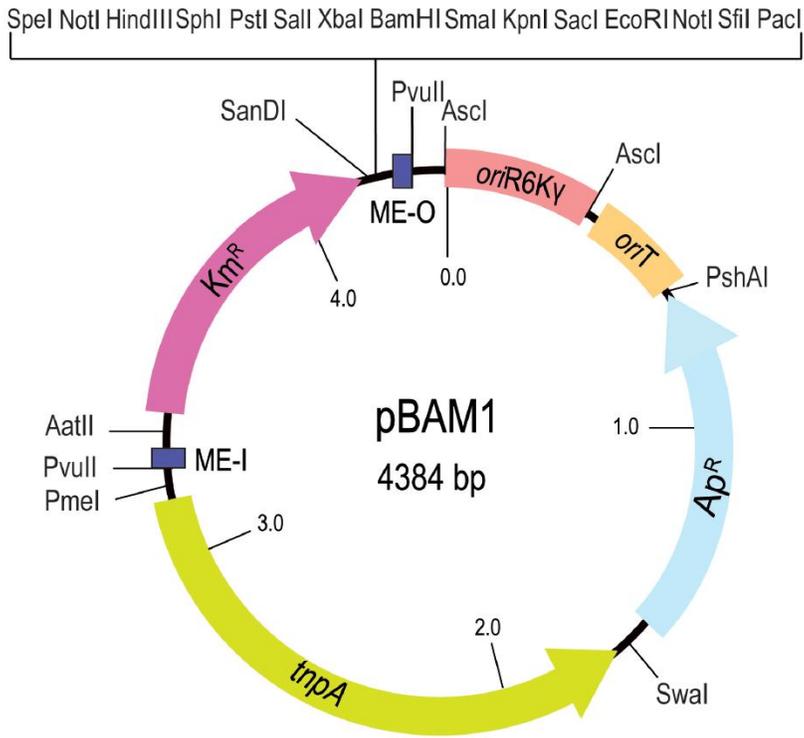


101



103

Mapa del plásmido p-BAM1



La figura muestra el mapa del plásmido utilizado en la conjugación entre la cepa donadora *E. coli* con *P. mirabilis* (Pr 2921) extraída de un paciente sintomático de ITU-c para la generación de la biblioteca de mutantes del laboratorio de Microbiología del IIBCE.