



## Molecular detection of *Bacteroides fragilis* in biopsies of diabetic foot infection in Mexico's northeast region

### Detección molecular de *Bacteroides fragilis* en biopsias de infecciones en pie diabético del Noreste de México

David Dorantes-Palma<sup>1</sup>, Wendy Lizeth Cruz-Pulido<sup>3</sup>, Eduardo Bladinieres-Camara<sup>2</sup>, Rodrigo Alcalá-Durán<sup>2</sup>, Virgilio Bocanegra-García<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Interacción Ambiente Microorganismo, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Boulevard del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Cd. Reynosa, Tamaulipas, Mexico.

<sup>2</sup>Instituto de Angiología y Cirugía Vascular del Noreste, Reynosa Tamaulipas, Mexico.

<sup>3</sup>Universidad Valle de México, Campus Reynosa, Tamaulipas, Mexico.

\*Corresponding author

E-mail address: [vbocanegg@hotmail.com](mailto:vbocanegg@hotmail.com) (V. Bocanegra-García)

Article history:

Received: 14 December 2018 / Received in revised form: 20 March 2019 / Accepted: 4 May 2019 / Published online: 1 July 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.3.12>

## ABSTRACT

Diabetic foot infection (DFI) is a worldwide health problem. In Mexico, 128000 amputation resulting from diabetic foot were reported in 2016, generating high economic costs. Part of this problem is because the correct identification of bacteria in DFI can take several days, and some pathogen agents are not readily detected. Additionally, routine cultures are focused on aerobic bacteria, leaving aside anaerobes detection, and because of that, anaerobes contribution of DFI infection is still controversial. Molecular methods allow indirect detection of anaerobic bacteria, so it is possible to estimate its prevalence. The aim of this works was to detect the presence of *Bacteroides fragilis* in biopsies of diabetic foot infection by PCR. 11.6% of the samples were positive for *B. fragilis* DNA, which indicated that a relevant prevalence of this bacterium is present in DFI. *B. fragilis* may play a role on the development of such infection and represent a health risk for the patients.

**Keywords:** Infections, diabetic foot, bacteria, *Bacteroides fragilis*, anaerobes, prevalence.

## RESUMEN

Las infecciones de pie diabético (IPD) son un problema de salud mundial. En México, 128 mil amputaciones se llevaron a cabo por pie diabético en el 2016, generando altos costos económicos. Esto debido en parte a que la identificación de las bacterias en las IPD es un proceso que puede llevar varios días por métodos microbiológicos, además, podrían generar un sesgo ya que los agentes patógenos podrían no ser identificados en su totalidad. Adicionalmente, los cultivos se enfocan generalmente al estudio de bacterias aerobias, dejando de lado el grupo de anaerobios, por lo cual su papel en estas infecciones es controversial. Los métodos moleculares permiten la detección indirecta de las bacterias anaerobias, de modo que es posible estimar su prevalencia. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Bacteroides fragilis* en biopsias de infecciones de pie diabético mediante PCR. El 11.6% de las muestras resultaron positivas lo que indica que existe una prevalencia relevante de esta bacteria en dichas infecciones, de modo que podría tomar parte en el desarrollo de dichas infecciones y representar un riesgo para los pacientes.

**Palabras clave:** Infecciones, pie diabético, bacteria, *Bacteroides fragilis*, anaerobios, prevalencia

## 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un problema en salud con gran impacto en todo el mundo y trae consigo graves complicaciones. La más común, generalmente más temprana en aparecer es el pie diabético que aproximadamente en el 15% al 25% de los pacientes con DM provoca la aparición de úlceras en el pie (Bayareh-Mancilla *et al.*, 2017). Esta complicación es ocasionada por un mal control de la glicemia, y se caracteriza por la confluencia de la neuropatía diabética periférica asociada a alteraciones mecánicas del pie y una mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones que pueden llevar a la amputación de las extremidades. Las úlceras tienen etiología multifactorial, variando la lesión vascular o la neurológica en cada caso, aunque una lesión mixta es frecuente, donde intervienen factores predisponentes como mal control metabólico y la edad, factores precipitantes como traumatismos o calzado inadecuados y factores agravantes como infección e isquemia (Schreiber, 2015). La infección del pie diabético (IPD), es definida como infección de los tejidos blandos o del hueso por debajo de los maléolos, se pueden clasificar como como leves, moderadas o graves (Lipsky *et al.*, 2004).

La prevalencia de patógenos en infecciones de pie diabético presenta variabilidad regional, y en diversos aspectos como la carga microbiana, la diversidad, y

asociación sinérgica entre especies microbianas (Noor *et al.*, 2015). Varios estudios se han realizado para estudiar la etiología de heridas infectadas en pie que generalmente se pueden incluir aerobios gram negativos, aerobios gram positivos y anaerobios (Wall *et al.*, 2002). Los microorganismos encontrados varían desde hongos del género *Candida* y bacterias como *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* sp; como microorganismo individual prevalece *S. aureus*, y como grupo bacteriano prevalecen las enterobacterias (Gardner *et al.*, 2013; Turhan *et al.*, 2013). Así mismo hay pocos estudios donde se estudia la presencia de bacterias anaerobias en diferentes tipos de infecciones y abscesos profundos observando mayor prevalencia de los géneros *Bacteroides* sp, *Prevotella* sp, *Fusobacterium* sp, *Porphyromonas* sp, *Clostridium* sp (Tran *et al.*, 2013), por otro lado, en estudios más específicos donde se tuvo como objetivo caracterizar el microbioma de úlceras de pie diabético utilizando la secuenciación del 16s, se logró la identificación de una gama más amplia de especies bacterianas que pueden ser importantes en el desarrollo de la cronicidad en estas heridas entre ellas, bacterias del grupo de anaerobios, por lo que su prevalencia y papel en el desarrollo y evolución de las infecciones sigue siendo controversial (Gardner *et al.*, 2013; Lorenzo *et al.*, 2012).

A la fecha las herramientas de biología molecular proporcionan medios poderosos para identificar las comunidades de microorganismos en la herida crónica de pie diabético, (Dowd *et al.*, 2008). Entre las herramientas moleculares disponibles están la amplificación de ácidos nucleicos por PCR y sus diferentes variantes que, asociada a la secuenciación del gen 16S ARNr presente en todas las bacterias, han apoyado a comprender la microbiología de las heridas (Price *et al.*, 2009). Dado que las bacterias anaerobias requieren precauciones especiales desde el momento de la toma de muestra y a lo largo de todo su procesamiento, aprovechamos las ventajas de las técnicas moleculares para detectar DNA correspondiente de una de las bacterias anaerobias detectada con mayor frecuencia, *Bacteroides fragilis*, por lo que el objetivo del trabajo fue detectar su prevalencia mediante PCR en muestras de biopsias derivadas de infecciones de pie diabético, del noreste de Tamaulipas.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Muestras biológicas**

Se utilizaron 112 biopsias de lesiones de pie diabético. Las biopsias fueron obtenidas con la colaboración con la clínica de Angiología y Cirugía Vascular del Noreste mediante debridación quirúrgica. Las muestras que se incluyeron provenían de pacientes mayores de 18 años, con signos de infección aguda y sin haber recibido tratamiento previo a la toma de muestra que se utilizaría para el seguimiento estándar de su infección y que aceptarían formar parte del estudio a través de la firma de consentimiento informado.

## 2.2 Extracción de DNA genómico

Se colocaron 100 mg de tejido de cada muestra, se añadieron 25 µl de proteinasa K y se incubó a 55°C por 16 horas con agitación. Después se estandarizó la extracción utilizando CTAB (bromuro de hexadeciltrimetil amonio), en combinación con el estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). En breve se agregaron 200 µl de solución lisis enzimática al tejido tratado con proteinasa K, se incubó 30 min a 37°C, luego se añadieron 300 µL de TE 1X y 30 µL de SDS al 10%, se incubó a 55°C durante 60 min, y luego se agregaron 100 µL de NaCl 5 M más 80 µL de solución CTAB y se incubó a 65°C por 10 min. Después de este paso se empleó el estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, resuspendiendo al final el DNA en buffer TE 1X pH 8 y almacenando en refrigeración hasta su uso.

## 2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la extracción e integridad del DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con TBE 1X. La electroforesis se realizó con un voltaje de 85 voltios por 60 minutos. La visualización de los ácidos nucleicos en gel se realizó en un equipo transiluminador UV con el gabinete y la cámara del sistema KODAK Gel Logic 100, el cuál utiliza el software KODAK Molecular Imaging v 4.0 (KODAK, USA) para la documentación de los productos.

## 2.4 Lisis celular

Se realizó la lisis celular de biopsias de pie diabético para la identificación de bacterias, se obtuvo un corte de 100 mg de tejido macerado en 500 µl de Agua mili Q y se incubó 15 minutos a 95°C, posteriormente se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

## 2.5 Amplificación de la región 16S ARN ribosomal

Para la amplificación de la región 16S de ARNr se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el termociclador Labnet®. Se utilizó el estuche de reacción Go Taq® Flexi DNA polymerase, los cebadores universales utilizados fueron 41F (5'-gct cag att gaa cgc tgg cg-3') y 1389R (5'-acg ggc ggt gtg tac aag-3') de acuerdo con el protocolo de Fisher *et al.* (2007) para obtener un amplicón con un tamaño de 1492 pb. Esto para utilizarlo como control para la presencia de microorganismos bacterianos dentro de las lesiones.

## 2.6 PCR de punto final específica para la identificación de *B. fragilis* en úlceras de pie diabético

Se realizó PCR de punto final para las 112 biopsias de pie diabético para la detección de *B. fragilis* con los iniciadores F- 5'cgg atg cca ttg ata aag tag g-3' y r-

5'ctg gaa gca agc aca tta gc-3' reportados por Papapaskevas *et al.* (2013) que amplifican una porción del gen *LEU* con un tamaño de 448 pb. Todas las PCR fueron realizadas en el termociclador Labnet®. Se utilizó el estuche comercial de reacción Go Taq® Flexi DNA polymerase (5U/μL), con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 25 mM y 10 μM de iniciadores. La reacción de PCR de llevo a cabo a una temperatura de desnaturalización de 95°C por 5 minutos, seguido de 95°C un minuto, temperatura de alineamiento 55°C por un minuto y 72° por un minuto durante 35 ciclos, y una temperatura de extensión de 72°C por diez minutos. Todas las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 15 μl.

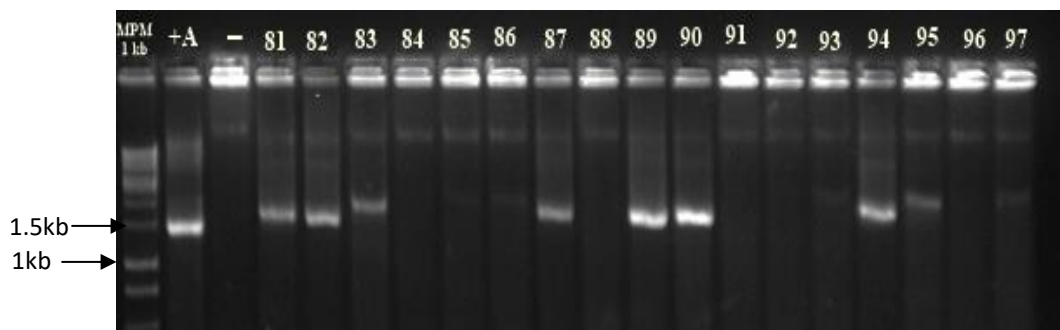
### 2.7 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la región 16S ARN ribosomal

La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, donde se colocarán 7 μL del producto de PCR y 2 μL de SYBER Green, utilizándose 1 μ de marcador de 1 kb. Se realizó la electroforesis a 85 voltios por 45 minutos. LA visualización del gel se llevó a cabo como se indica en 2.3.

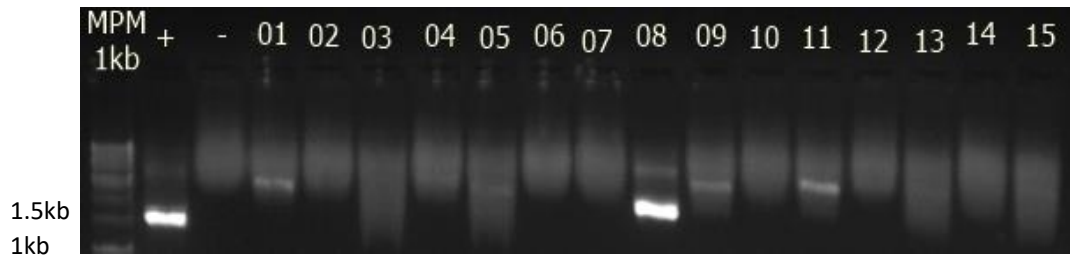
## 3. RESULTADOS

### 3.1 Detección del gene16S ARN ribosomal en las muestras

De las 112 muestras procesadas 61 (54.4%) resultaron positivas para el gen 16s RNAr y 51 (45.5%) negativas. Por otro lado, en los lisados 18 muestras (16%) resultaron positivas para el 16s RNAr y 63 (56.2) negativas. Lo que nos indicó que el análisis era mas adecuado en el DNA extraído de las muestras, y no en las muestras tratadas por lisis térmica. (Figs. 1 y 2)



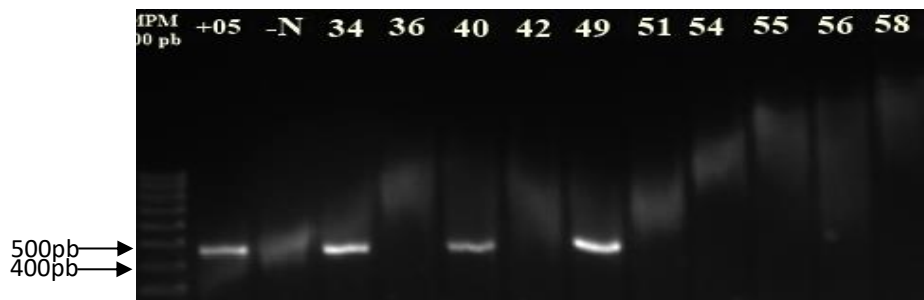
**Fig. 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR del gen 16s de ARNr a partir de extracción de DNA. Carril MPM: Marcador 1 kb. Carril +A, control positivo (DNA *Azospirillum* sp). Carril -, control negativo. Carril 4-20 Diferentes muestras de biopsias.



**Fig. 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR del gen 16s de ARNr a partir de lisados. Carril MPM: Marcador 1 kb. Carril +, control positivo, carril -, control negativo. Carriles 01-15 Diferentes muestras de biopsias.

### 3.2 Detección de *B. fragilis* mediante PCR

Por otro lado, en la PCR específica para la detección de *B. fragilis* se utilizó el DNA extraído de las 112 muestras donde 13 dieron positivas (Fig. 3) mientras que en las muestras procesadas por lisis térmica no se obtuvo amplificación para el gen *LEU* de *B. fragilis*, reiterándonos que la lisis térmica no fue un método efectivo para la liberación de ácidos nucleicos a partir de tejido.



**Fig. 3.** Electroforesis del producto de PCR del gen *LEU* de *B. fragilis* a partir de extracción de DNA. Carril MPM, marcador 100 pb; Carril +05, control +; carril -N, control Negativo; Carril 4-13 Diferentes muestras de biopsias.

## 4. DISCUSIONES

Dentro de la microbiología de las infecciones de pie diabético, el papel de las bacterias anaerobias ha sido controversial, debido a que, por su dificultad técnica para cultivo, no se detectan en forma rutinaria, y los reportes que existen tienen como objetivo desde el principio el cultivo de anaerobios, lo cual no permite generalizar su papel y prevalencia en las infecciones de úlceras de pie diabético.

Debido a esto, decidimos una aproximación indirecta, al buscar material genético relacionado a los anaerobios en biopsias de infecciones de pie diabético, para tener una primera estimación de su prevalencia en nuestra región (noreste de Tamaulipas). Tomando como base los reportes de prevalencia internacionales, decidimos comenzar con la detección de *B. fragilis*.

A partir de las 112 muestras de biopsias para detectar la presencia del gen *LEU* de *B. fragilis*, 13 (11.6%) resultaron positivas, mientras que 99 fueron negativas (88.3%). Hasta donde pudimos investigar, no tenemos conocimiento de estudios reportados para anaerobios en infecciones de pie diabético en México. Ng *et al.* (2008) realizaron cultivos de anaerobios de muestras tomadas a partir de 30 muestras de infecciones de pie diabético (en Singapur) y reportaron presencia de bacterias anaerobias estrictas como *Peptostreptococcus* spp. (46%) y *B. fragilis* (19%) que representa un porcentaje similar a nuestros hallazgos. Por otro lado, Claros *et al.* (2013) realizaron un estudio multicéntrico en los Estados Unidos, donde estudiaron las diferencias en la diversidad microbiana de anaerobios en infecciones intraabdominales complicadas versus infecciones del pie diabético, observaron una gran diferencia en la prevalencia de las bacterias anaerobias detectadas, siendo el grupo de *Bacteroides* prevalente en un 10% en las muestras a partir de infecciones de pie diabético. Shenoy *et al.* (2017) de la India, reportaron un estudio retrospectivo de la frecuencia del aislamiento de diferentes bacterias anaeróbicas durante el período 2011 y 2015, donde incluyeron muestras clínicas, ellos aislaron anaerobios patógenos a partir de 278 (12,4%) de 2227 muestras procesadas. Los anaeróbicos predominantes fueron *F. magna*, seguido de *B. fragilis*.

A pesar de las bacterias anaerobias se detectan en entre un 12-40% de muestras analizadas específicamente para su detección, aun no se ha generalizado su determinación de manera rutinaria, en nuestro estudio, basado solo en la detección de DNA, 11.6% de las muestras de biopsia resultaron positivas para *B. fragilis*, indicando que en dichos pacientes al momento de su estudio para controlar la infección de pie diabético tenían bacterias anaerobias presentes, cabe destacar que este estudio es retrospectivo, de modo que en su momento, las muestras de los pacientes solo se analizaron mediante cultivos bacteriológicos comunes y en base a eso se tomaron las decisiones de su tratamiento. Debido al bajo número de estudios dedicados a la detección de anaerobios en infecciones de pie diabético, tampoco hay un consenso sobre su papel en la evolución de las infecciones, ya que es importante distinguir si se encuentran como colonizadores o como agentes activos en la progresión de la infección.

Respecto a nuestros resultados, en muestras recién obtenidas y con las precauciones adecuadas para proteger anaerobios, la prevalencia de *B. fragilis* podría ser aún mayor, y esto representar un riesgo en los pacientes, ya que *B. fragilis* tiene factores de patogenicidad y puede presentar resistencia a antimicrobianos que podrían conferirle capacidad patogénica sobre las úlceras de pie diabético.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Bayareh-Mancilla R., Vera-Hernández A., Leija-Salas L., Ramos A. & Gutierrez-Martínez J. 2017. Characterization of a Longwave infrared imager for the telemetric measurement of human skin temperature of diabetic foot. Pan American Health Care Exchange. PAHCE (pp. 1-5).

Claros M., Citron D. M., Goldstein E. J., Merriam C. V., & Tyrrell, K. L. 2013. Differences in distribution and antimicrobial susceptibility of anaerobes isolated from complicated intra-abdominal infections versus diabetic foot infections. Diagnostic microbiology and infectious disease, 76(4): 546-548.

Dowd S. E., Wolcott R. D., Sun Y., McKeenan T., Smith E. & Rhoads D. 2008. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). PLoS One. 3(10): e3326

Fisher M., Miller D., Brewster C., Husseneder C. & Dickerman A. 2007. Diversity of Gut Bacteria of *Reticulitermes flavipes* as Examined by 16S rRNA Gene Sequencing and Amplified rDNA Restriction Analysis. Current Microbiology. 2007. 55(3): 254

Gardner S. E., Hillis S. L., Heilmann K., Segre J. A. & Grice E. A. 2013. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. Diabetes 2013. 62(3): 923–930.

Lipsky B. A., Berendt A. R., Deery H. G., Embil J. M., Joseph W. S., Karchmer A. W. & Tan J. S. 2004. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. Clinical Infectious Diseases. 39(7): 885-910.

Lorenzo M., García N., Ayala J. A., Vadillo S., Píriz S. & Quesada, A. 2012. Antimicrobial resistance determinants among anaerobic bacteria isolated from footrot. Veterinary microbiology. 157(1-2): 112-118.



Ng L. S., Kwang L. L., Yeow S. C. & Tan, T. Y. 2008. Anaerobic culture of diabetic foot infections: organisms and antimicrobial susceptibilities. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 37(11): 936-939.

Noor S., Zubair M. & Ahmad J. 2015. Diabetic foot ulcer - A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes and Metabolic Syndrome Clinical Research*. 9(3): 192-199

Papaparaskevas J., Mela V., Houhoula D. P., Pantazatou A., Petrikkos G. L. & Tsakris A. 2013. Comparative Evaluation of Conventional and Real-Time PCR Assays for Detecting *Bacteroides fragilis* in Clinical Samples. *Journal of clinical microbiology*. 51(5): 1593-1595.

Price L. B., Liu C. M., Melendez J. H., Frankel Y. M., Engelthaler D., Aziz M., Bowers J., Rattray R., Ravel J., Kingsley C., Keim P. S., Lazarus G. S. & Zenilman J. M. 2009. Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: Impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota. *PLoS One* . 4(7) e 6464.

Schreiber A. K. 2015. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World Journal of Diabetes*. . 6(3): 432-444

Shenoy P. A., Vishwanath S., Gawda A., Shetty S., Anegundi R., Varma M., & Chawla K. 2017. Anaerobic Bacteria in Clinical Specimens—Frequent, But a Neglected Lot: A Five Year Experience at a Tertiary Care Hospital. *Journal of clinical and diagnostic research: Journal of clinical diagnostic Research*. 11(7): DC44DC48

Tran C. M., Tanaka K., & Watanabe, K. 2013. PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 19(2): 279-290.

Turhan V., Mutluoglu M., Acar A., Hatipoğlu M., Önem Y., Uzun G., Ay H., Öncül O. & Görenek L. 2013. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 7(10): 707-712.

Wall I. B., Davies C. E., Hill K. E., Wilson M. J., Stephens P., Harding K. G. & Thomas D. W. 2002. Potential role of anaerobic cocci in impaired human wound healing. *Wound Repair and Regeneration*., 10(6): 346–353.