



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Efecto de las fuentes de carbono en la
expresión genética de los genes
involucrados en la síntesis de la tilivalina en
*Klebsiella oxytoca***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA

Cárdenas Pérez Rogelio

Asesor: Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas

Coasesor(a): M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de las fuentes de carbono en la expresión genética de los genes involucrados en las síntesis de la Tilivalina en *Klebsiella oxytoca*.

Que presenta el pasante: Rogelio Cárdenas Pérez

Con número de cuenta: 311208542 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Agosto de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Miguel Ángel de la Cruz Villegas, asesor de tesis, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutela y por todo el tiempo que ha dedicado en guiarme desde el inicio hasta el final.

A la Maestra Ana Laura Vázquez Martínez, co-asesora, no solo por su guía en este trabajo, sino por toda su labor como docente, por todo el tiempo y esfuerzo dedica a la educación, porque realiza un excelente trabajo como profesora.

A mi familia por todo su apoyo y porque siempre hemos estado juntos, desde las risas más pequeñas y espontáneas hasta los momentos más difíciles, siempre encontramos la fuerza para superar los obstáculos y volver a sonreír.

A mi padre, José Francisco por ser el sostén de esta familia y por levantarte día tras día para ir a trabajar por tu familia, desde la madrugada hasta en la noche y aun así siempre encontrar el tiempo para estar con tu familia.

A mi madre Silvia, por ser el pilar de esta familia y sacarnos adelante con tu esfuerzo y sacrificios, gracias por la dedicación que tienes con tus hijos, porque gracias a ti he logrado llegar hasta el final.

Muchas gracias a mis padres, porque los hijos somos el reflejo de nuestros padres y gran parte de la persona en quien nos convertimos en el futuro es debido a sus sacrificios y enseñanzas.

A mi pareja Sol, porque juntos hemos crecido durante nuestra formación profesional y no solo eso, por ser la persona que más me apoyó junto a mis padres para llegar hasta el final, porque siempre estuviste a mi lado, día tras día desde lo más sencillo hasta en los momentos más difíciles, gracias por cariño, tu apoyo y estar siempre ahí cuando más lo he necesitado.

A mis compañeros, porque a lo largo de la carrera he conocido increíbles personas que me extendieron su mano sin pedirla y en especial a mi amigo Milton, por caminar a mi lado todos estos años y brindarme su apoyo tanto académico y personal, gracias.

A todos mis profesores de la carrera, porque todos siempre tienen algo que aportarte para crecer ya sea académica o personalmente, bueno o malo, y en especial gracias a los profesores de mi jurado, por dedicar parte de su tiempo en revisar y ayudarme a mejorar mi trabajo final.

Finalmente, a la UNAM por brindar la oportunidad de estudiar una carrera profesional a los mexicanos y en especial a la FES Cuautitlán, por albergar mi carrera Bioquímica Diagnóstica y brindar a los alumnos la mejor formación profesional mediante sus instalaciones, docentes y trabajadores, gracias por ser mi segundo hogar.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. GENERALIDADES.....	3
2.1.1. Estructura bacteriana	3
2.1.2. Genética bacteriana.....	8
2.1.3. Crecimiento bacteriano	9
2.1.4. Metabolismo bacteriano	10
2.2. EL GÉNERO <i>KLEBSIELLA</i>	16
2.2.1. Factores de virulencia de <i>Klebsiella</i>	17
2.3. <i>KLEBSIELLA OXYTOCA</i>	19
2.3.1. Taxonomía e identificación de <i>Klebsiella oxytoca</i>	20
2.4. TOXINA TILIVALINA	21
2.4.1. Organización genética	22
2.4.2. Biosíntesis	23
2.5. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS	26
2.5.1. Cultivo bacteriano.....	26
2.5.2. Extracción de material genético	27
2.5.3. Cuantificación del material genético	29
2.5.4. Caracterización o integridad del DNA.....	29
2.5.5. PCR.....	30
2.5.5.1. qPCR	32
4. JUSTIFICACIÓN.....	33
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. HIPÓTESIS	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1. MATERIALES PARA CULTIVO BACTERIANO	34
6.2. METODOLOGÍA.....	34
6.2.1. Identificación	34
6.2.2. Crecimiento bacteriano	35

6.2.3. Extracción de DNA genómico	36
6.2.4. Amplificación de los genes <i>rrsH</i> , <i>mfsX</i> , <i>npsA</i> y <i>aroX</i> mediante PCR de punto final.	36
6.2.5. Estandarización del método RT-qPCR de los genes <i>rrsH</i> , <i>mfsX</i> , <i>npsA</i> y <i>aroX</i> de <i>Klebsiella oxytoca</i> a partir de curvas estándar	37
6.2.6. Extracción de RNA total	38
6.2.7. Síntesis del cDNA	39
6.2.8. qPCR.....	40
7. RESULTADOS Y OBSERVACIONES.....	42
7.1. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO	42
7.2. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS TIPO	42
7.3. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL BACTERIANO	45
7.4. EXPRESIÓN GENÉTICA DE LOS GENES EVALUADOS EN PRESENCIA DE GLUCOSA, GLICEROL Y SAL.....	46
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS	52
11. REFERENCIAS	53
12. ANEXO	57

Índice de figuras

Figura 1. Morfología Bacteriana.....	3
Figura 2. Estructura de la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	5
Figura 3. Componentes estructurales del flagelo bacteriano.	7
Figura 4. Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.	8
Figura 5. Curva de crecimiento bacteriano.	10
Figura 6. Diferencia entre respiración y fermentación.	12
Figura 7. Esquema de la fermentación.....	13
Figura 8. Vía de las pentosas fosfato.....	14
Figura 9. Vía de Entner-Doudoroff.	15
Figura 10. Cultivo de <i>Klebsiella oxytoca</i>	17
Figura 11. Factores de virulencia en <i>Klebsiella spp</i>	19
Figura 12. <i>Klebsiella oxytoca</i>	20
Figura 13. Tilivalina.....	21
Figura 14. Isla de patogenicidad de la tilivalina.	22
Figura 15. Biosíntesis de la tilimicina.	24
Figura 16. Biosíntesis de la tilivalina.....	25
Figura 17. PCR.	31
Figura 18. Ct's de una PCR en tiempo real.	32
Figura 19. Electroforesis del DNA genómico de <i>Klebsiella oxytoca</i> 09-7231.	42
Figura 20. Curvas de amplificación de los genes <i>rrsH</i> , <i>mfsX</i> , <i>npsA</i> y <i>aroX</i>	43
Figura 21. Linealización de las curvas de amplificación (curvas tipo) de los genes <i>rrsH</i> , <i>mfsX</i> , <i>npsA</i> y <i>aroX</i>	44
Figura 22. Curvas de desnaturalización de los productos de amplificación de los genes <i>rrsH</i> , <i>mfsX</i> , <i>npsA</i> y <i>aroX</i>	45
Figura 23. Electroforesis del RNA total de <i>Klebsiella oxytoca</i> en las diferentes condiciones de crecimiento.	46
Figura 24. Expresión relativa de los genes relacionados a la síntesis de la tilivalina en presencia de glucosa, glicerol y sal.	47
Figura 25. Mecanismo de acción de la proteína CRP o CAP sobre el operón lac.....	48

Índice de tablas.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Klebsiella oxytoca</i>	20
Tabla 2. Pruebas bioquímicas para especies del género <i>Klebsiella</i>	21
Tabla 3. Características de la tilivalina.	21
Tabla 4. “Clúster” genético de la isla de patogenicidad de la tilivalina.	22
Tabla 5. Tipos de PCR.	31
Tabla 6. Materiales.....	34
Tabla 7. Pruebas Bioquímicas.....	34
Tabla 8. Prueba de sensibilidad.....	34
Tabla 9. Concentración de reactivos.	35
Tabla 10. Subcultivos: Condiciones de crecimiento bacteriano.....	35
Tabla 11. Solución de lisis.....	38
Tabla 12. Tratamiento del DNA residual.	39
Tabla 13. Mezcla de reacción para transcripción.....	39
Tabla 14. Condiciones para la síntesis del cDNA en cada condición.....	40
Tabla 15. Mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real.	40
Tabla 16. Condiciones para la PCR en tiempo real.....	41
Tabla 17. Temperatura de alineamiento (Tm).	42
Tabla 18. Concentración y pureza de los RNA extraídos en <i>Klebsiella oxytoca</i> en las diferentes condiciones empleadas.....	45
Tabla 19. Pruebas bioquímicas completas.....	57
Tabla 20. Contenido de los pocillos.....	57
Tabla 21. Tabla de sensibilidad	58

Abreviaturas

A.- Adenina

AAHC. - Colitis Hemorrágica Asociada al uso de Antibióticos (Por sus siglas en inglés "Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis")

ADP. - AdenosinTriFosfato

ATP. - AdenosinDifosfato

C. - Citosina

CRP. - Proteína Receptora de cAMP (Por sus siglas en inglés "cAMP Receptor Protein")

Ct's. - Umbral de ciclo (Por sus siglas en inglés "Cycle threshold")

cDNA. - Ácido Desoxirribonucleico complementario (Por sus siglas en inglés "complementario Deoxiribonucleic acid")

CTAB. - Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio. (Por sus siglas en inglés "CetylTrimethylAmmonium Bromide")

DEPC. - Pirocarbonato de Dietilo (Por sus siglas en inglés "Diethyl pyrocarbonate")

DNA. - Ácido desoxirribonucleico (Por sus siglas en inglés "Deoxyribonucleic acid")

dNTP's. - Desoxiribonucleótidos trifosfato (Por sus siglas en inglés "DeoxyriboNucleic TriPhosphate")

EDTA. - Ácido Etilendiaminotetraacético

FAD. - Flavín Adenin Dinucleótido

G. - Guanina

HeLa. - Henrietta Lacks; células de carcinoma cérvico-uterino

H-NS. - Proteína estructural tipo histona (Por sus siglas en inglés "Histone-like Nucleoid Structuring")

HEP-2. - Human Invasión type 2; células de epitelio humano tipo 2

IAAS. - Infecciones asociadas a la atención de la salud

IIH. - Infecciones intrahospitalarias

LPS. - Lipopolisacáridos

mRNA. - Ácido Ribonucleico mensajero

NAD. - Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NAG. - N-AcetilGlucosamina

NAM. - N-AcetilMurámico

NRPS. - Péptido Sintasa No Ribosomales (Por sus siglas en inglés “Non-Ribosomal Peptide Synthetase”)

“ON”. - Toda la noche (Por sus siglas en inglés “Over Night”)

PBD. - Pirrolobenzodiazepina

PCR. - Reacción en cadena de la polimerasa (Por sus siglas en inglés “Polymerase Chain Reaction”)

qPCR. - Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Por sus siglas en inglés “quantitative Polymerase Chain Reaction”)

RNA. - Ácido ribonucleico (Por sus siglas en inglés “Ribonucleic Acid”)

rRNA. - Ácido ribonucleico ribosomal

RT-PCR. - Reacción en cadena de la polimerasa Transcriptasa Reversa (Por sus siglas en inglés “Retro-Transcriptase Polymerase Chain Reaction”)

SDS. - Dodecilsulfato sódico

T. - Timina

Tm. - Temperatura de hibridación (Por sus siglas en inglés “Temperature Melting”)

TAE. - Tris-Acetato-EDTA

TBE. - Tris-Borato-EDTA

U. - Uracilo

1. RESUMEN

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) o también llamadas infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) son aquellas adquiridas durante la estancia en un hospital y que no estaban presentes antes del momento de ingreso al hospital. La importancia de estos eventos recae en la frecuencia con la que se producen, la morbilidad y mortalidad que provocan, la carga que imponen a los pacientes, al personal sanitario y el costo a los sistemas de salud estimando un gasto aproximado de 160 millones de dólares de acuerdo con registros del 2009 en México (Arreguín *et al.*, 2012; López, 2010).

Los patógenos asociados a IIH pueden proceder de fuentes exógenas o endógenas. Los agentes asociados a fuentes endógenas se presentan en la microbiota del paciente, como en el tracto intestinal. La contaminación exógena es causada por el movimiento de microorganismos desde fuentes externas, como la microbiota residente en las manos, piel del personal de salud, instrumento biomédico contaminado y el medio ambiente hospitalario.

Los principales agentes implicados son: Bacilos Gram negativos de los géneros *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia*; Bacilos Gram positivos como *Streptococcus β-hemolítico*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. También los hongos juegan un papel muy importante en las IIH, principalmente *Candida albicans* y *Candida glabrata*, de igual forma los virus adquieren importancia clínica en las IIH (Pérez *et al.*, 2010).

El género *Klebsiella* alberga patógenos de importancia clínica para los humanos, ya que algunas especies están implicadas en el incremento de morbilidad entre la población de pacientes de hospitales. Normalmente se encuentran en agua, suelo, tracto intestinal de humanos y animales, al ser considerado como parte de la microbiota humana puede provocar infecciones en pacientes hospitalizados ya que cuentan con sistema inmune debilitado, incrementando las probabilidades de prolongar su estancia en hospitales o incluso graves complicaciones que podrían culminar en la muerte del paciente.

Algunas especies son responsables de enfermedades como bronconeumonías, infecciones de tracto urinario y septicemias en pacientes admitidos. La especie más representativa del género *Klebsiella* es *Klebsiella pneumoniae* por su resistencia a fármacos, seguida de *Klebsiella oxytoca* que ha elevado su importancia por el aumento en su presencia de aislados en muestras clínicas y a la eficacia de los nuevos métodos de diagnóstico que permiten una distinción certera entre ellas (Singh *et al.*, 2016).

La terapia con antibióticos en pacientes donde su tratamiento se prolonga por largo tiempo provoca un desequilibrio en la microbiota intestinal, disminuyendo el ecosistema bacteriano favorable para el ser humano y perpetuando la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos. Algunas investigaciones han demostrado que *Klebsiella oxytoca* posee la capacidad de producir una toxina de naturaleza peptídica identificada como “tilivalina”, caracterizada por su acción citotóxica y por ello adquiere importancia en enfermedades crónico degenerativas desarrolladas en colon de pacientes hospitalizados.

Recientemente se ha relacionado al síndrome de Colitis Hemorrágica Asociada al uso de Antibióticos (AAHC, por sus siglas en inglés “Antibiótic-Associated Hemorrhagic Colitis”) con el agente *Klebsiella oxytoca*, y ha tomado mayor importancia por la presencia de diarrea sanguinolenta, la cual puede ser diagnosticada erróneamente como sangrado gastrointestinal inferior o enfermedad crónica del intestino, provocando graves secuelas en el paciente a causa de su mal diagnóstico y tratamiento tardío (Youn *et al.*, 2018).

Las bacterias poseen una alta sensibilidad para la detección de las condiciones en el medio en el que se encuentran, tales como la presencia de compuestos indispensables para su supervivencia como es el caso de las fuentes de carbono para la síntesis de energía y de igual manera, sustancias nocivas como altas concentraciones de sales; por ello han desarrollado sistemas de defensa que las protegen y alteran el medio a su conveniencia, como el desarrollo de cápsulas y producción de toxinas, entre otras características (Castro, 2014).

En este trabajo se experimentó con la presencia de diferentes fuentes de carbono y concentraciones de sal como factores que influyen en estabilidad y supervivencia de la bacteria *Klebsiella oxytoca*. Utilizando glucosa, glicerol y cloruro de sodio en altas concentraciones se evaluó el efecto que provocan estas condiciones sobre la expresión genética de tres de los genes que se encuentran en la isla de patogenicidad (*npsA*, *mfsX*, y *aroX*), y que participan en la síntesis de la tilivalina.

Como resultado se encontró un incremento de la expresión con glucosa y glicerol, excepto para gen para *mfsX* sólo en glucosa, y la disminución de la expresión en todos los genes en cloruro de sodio y concluyendo que las condiciones evaluadas poseen un efecto significativo sobre los reguladores transcripcionales en la expresión de la tilivalina en *Klebsiella oxytoca*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

Las bacterias son organismos unicelulares clasificados como procariotas, dado que carecen de una membrana que recubra su material genético. Se encuentran agrupadas dentro del dominio Bacteria, uno de los tres dominios descritos en el árbol de la vida de Woese y las cuáles se han determinado que emergieron hace unos 3.6 – 4 billones de años con base en estudios fósiles y modelos. Poseen una estructura superficial compleja que rodea la membrana celular y le confiere rigidez a la célula llamada “pared celular”, de igual manera le proporciona otras características de utilidad a las bacterias para su clasificación y fisiopatología (Audesirk y Byers, 2003; Castro, 2014).

2.1.1. Estructura bacteriana

Las bacterias son de tamaño y forma muy variada, la mayoría miden entre 0.2 y 2 μm de diámetro y 8 μm de largo. Las formas más comunes que se pueden encontrar son: cocos esféricos, bacilos (forma de bastones) y espirales.

Los cocos que pueden encontrarse son redondos u ovalados, alargados o con uno de sus lados aplanados, al agruparse pueden permanecer unidos en pares denominados **diplococos** o pueden formar grupos de cuatro llamados **tétradas**, cadenas conocidas como **estreptococos** y grupos similares a racimos de uvas llamados **estafilococos**. Los bacilos generalmente se pueden observar como bastones aislados o en pares como **diplobacilos**, formando cadenas, **estreptobacilos**, algunos ovalados llamados **cocobacilos** y **bacilos curvos** llamados vibriones. Otro grupo de bacterias en forma de espiral están compuestas por microorganismos helicoidales y flexibles llamados **espiroquetas** (Tortora *et al.*, 2007).

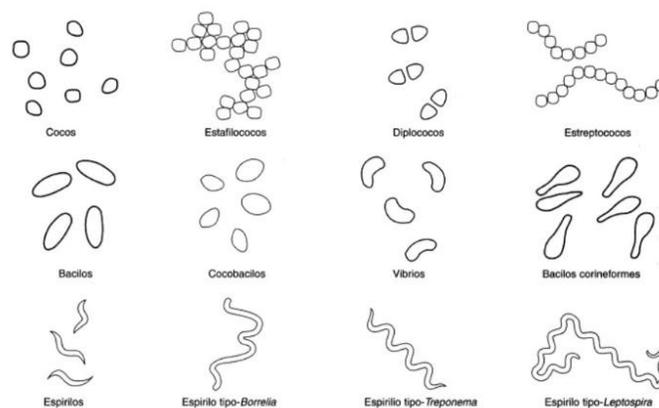


Figura 1. Morfología Bacteriana. Clasificación de las diferentes formas de las bacterias agrupadas en tres grupos: cocos, bacilos y espirilos. Fuente: Koneman y Allen, 2013.

Las bacterias están constituidas por dos tipos de estructuras:

- Elementos obligados: Presentes en todas las bacterias e indispensables para la supervivencia de las bacterias. Pared celular, membrana plasmática, citoplasma, ribosomas y la región nuclear.
- Elementos facultativos: Pueden estar o no presentes en la bacteria y proporcionan características y cualidades singulares. Cápsula, flagelos, pilis, endosporas e inclusiones citoplasmáticas (Granados y Villaverde, 2003).

Pared celular. Representa una de las estructuras más características de la bacteria, ya que proporciona la forma, rigidez y protección contra fuerzas osmóticas y físicas. Se localiza en la parte más externa de la célula, compuesta por varias capas de peptidoglucano, también conocido como mureína, un disacárido. Su estructura básica está representada por la unión alterna de NAG y el NAM mediante enlaces β 1 – 4 formando una cadena. Existen diferencias en la pared celular que ha llevado a clasificar a las bacterias en dos grandes grupos, las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Castro, 2014).

- **Gram positivas.** Cuentan con una pared celular grande (25 nm), compuesta por varias capas de peptidoglucano, con componentes únicos de las Gram positivas, como los ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por un alcohol (p. ej., glicerol o ribitol) y fosfato. Existen dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico, que abarca toda la capa de peptidoglucano y está unida a la membrana plasmática, y el ácido teicoico mural, unido a la capa de peptidoglucano. Estas estructuras de carga negativa (generada por los grupos fosfato) le confieren carga superficial, además de estimular la respuesta inmune y sirven de adhesión para algunas bacterias. Mediante la tinción de Gram se observa color azul debido al primer colorante cristal violeta que penetra en la pared celular y permanece (Tortora *et al.*, 2007).
- **Gram negativas.** Se compone por una capa o pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano se une a una lipoproteína (lípidos unidos covalentemente a una proteína) de la membrana externa y se encuentra en el espacio periplasmático, el cual se compone por una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. El periplasma contiene altas concentraciones de enzimas degradantes y proteínas de transporte. La pared celular no contiene ácidos teicoicos en contraste con la pared de las Gram positivas. La membrana externa está compuesta por LPS, lipoproteínas y fosfolípidos. Su intensa carga negativa dificulta la fagocitosis y la actividad del complemento. La permeabilidad de la membrana externa se debe en parte a la presencia de proteínas llamadas porinas, que forman canales en la membrana. El LPS es responsable de dos características importantes de la bacteria. En primer lugar, la fracción polisacárido está compuesta por azúcares llamados polisacáridos O que actúan como antígenos y son útiles para diferenciar las especies bacterianas. En segundo lugar, la porción lipídica del lipopolisacárido, denominada lípido A, se conoce con el nombre de endotoxina y ejerce un efecto tóxico sobre la circulación sanguínea o en el aparato digestivo del hospedero. La presencia de una pared delgada permite la remoción

del primer colorante en la tinción de Gram (Cristal violeta) y conservando el segundo colorante (Safranina) reteniendo un color rosado (Struthers y Westran, 2005; Tortora *et al.*, 2007).

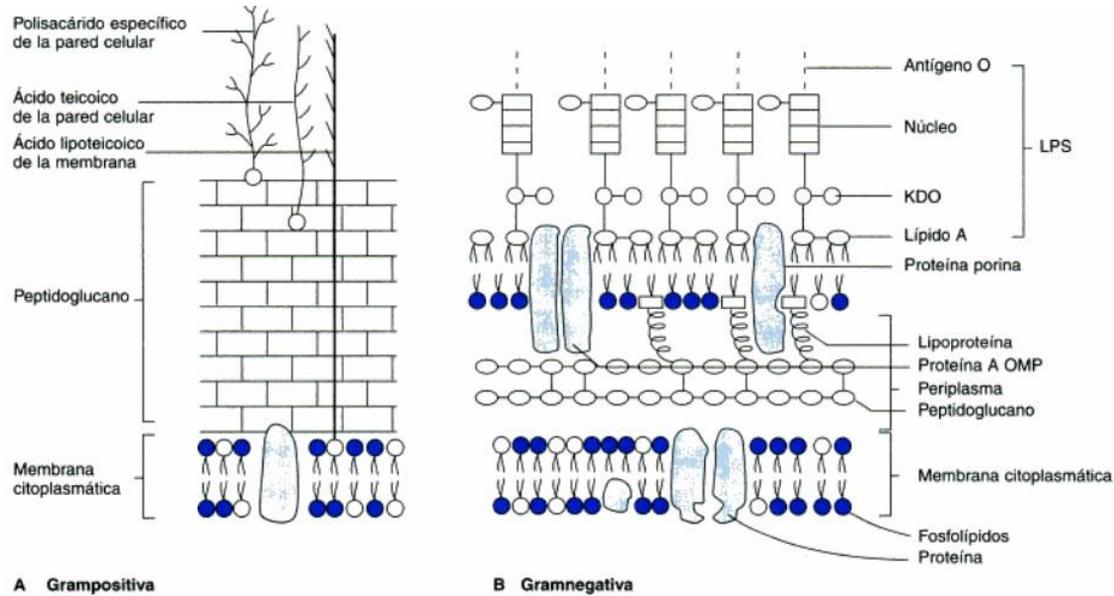


Figura 2. Estructura de la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La pared de las bacterias Gram negativas posee membrana externa y una capa de peptidoglucano, mientras que las Gram positivas se componen por varias capas de peptidoglucano y no poseen membrana externa. Fuente: Koneman y Allen, 2013.

Membrana citoplasmática. Es una estructura delgada y compuesta por una bicapa fosfolipídica con proteínas intercaladas. Su función es la permeabilidad selectiva, transporte de solutos, organización metabólica, síntesis, fosforilación oxidativa en organismos aeróbicos, liberación de enzimas hidrolíticas y reciclamiento de receptores (Castro, 2014; Struthers y Westran, 2005).

Citoplasma. Es un medio acuoso, espeso, semitransparente y elástico. Se compone de un 80% de agua y alberga proteínas (enzimas), aminoácidos, carbohidratos, nucleótidos, sales, vitaminas, iones y todo lo necesario para la actividad enzimática. Es el lugar donde se desarrollan las reacciones bioquímicas destinadas al crecimiento, división y metabolismo bacteriano. También es el espacio que contiene los ribosomas, cuerpos de inclusión, cromosoma bacteriano y plásmidos (Castro, 2014; Tortora *et al.*, 2007).

Ribosomas. Son los responsables de la síntesis de proteínas, se componen de dos subunidades 50S y 30S, que en conjunto poseen un coeficiente de sedimentación de 70S.

Cada subunidad está constituida por rRNA. La letra S se refiere a las unidades Svedberg, que indica la unidad de sedimentación relativa durante la centrifugación ultrarrápida (Castro, 2014; Tortora *et al.*, 2007).

Cuerpos de inclusión. Son depósitos para almacén de nutrientes que la bacteria puede acumular en condiciones favorables para luego utilizar en condiciones adversas como vía de supervivencia, (carbono, nitrógeno, azufre y fósforo) (Castro, 2014; Tortora *et al.*, 2007).

Plásmidos. Elementos extracromosomales compuestos de DNA de doble cadena circular con replicación autónoma. De menor tamaño que el cromosoma bacteriano y representan la mayor importancia en la patogénesis ya que pueden transferirse de una bacteria a otra conteniendo genes de resistencia a antibióticos y otros elementos de virulencia (Castro, 2014).

Islas de patogenicidad. Las islas de patogenicidad son secuencias de DNA que contienen genes asociados a virulencia y que pueden estar tanto en plásmidos, como en el cromosoma bacteriano. Poseen elementos genéticos móviles, como transposasas e integrasas que permite la inserción en sitios determinados del genoma bacteriano. Su tamaño es de entre 10 y 500 kpb. Entre los genes de virulencia asociados a estas islas de patogenicidad tenemos: adherencia, producción de toxinas, invasividad, resistencia a antibióticos y formación de biopelícula (Molina, 2017).

Cápsula. Cubierta de grosor variable y formada generalmente por polisacáridos, proteínas o ambos. Se le denomina cápsula cuando se encuentra fuertemente unida a la pared bacteriana, y en contraste, se le denomina glicocálix cuando se encuentra mal definida y débilmente unida a la pared. La rigidez le confiere impermeabilidad ante antibióticos y algunos solutos, además de protección contra la fagocitosis y anticuerpos. Determina la adhesión a las superficies (biopelícula) (Castro, 2014).

Glicocálix. Secreción superficial de algunas bacterias. El glicocálix (capa de azúcar) es un polímero viscoso (adherente) y gelatinoso que se encuentra localizado por fuera de la pared celular y se compone de polisacáridos, polipéptidos o ambas sustancias. Si la sustancia que lo compone se adhiere fuertemente a la pared celular, el glicocálix recibe el nombre de cápsula (Tortora *et al.*, 2007).

Flagelos. Organelo encargado de la locomoción de las bacterias, utiliza cerca de 40 genes para su construcción. Se compone por tres partes: filamento, gancho y cuerpo basal.

La rotación es estimulada por el flujo de protones a través del espacio periplásmico y un apagador determina la dirección de la rotación, lo que a su vez determina si la bacteria se desplaza en sentido de las manecillas del reloj o contrario. El filamento externo es una estructura cilíndrica, hueca y compuesta por un arreglo helicoidal de la proteína flagelina. Esta proteína es inmunogénica y constituye el antígeno "H" o flagelar, utilizado para la serotipificación de enterobacterias como *Escherichia coli* entre otros. Los flagelos poseen gran importancia para la colonización de tejidos y evadir la respuesta inmune. Cuando el flagelo rota en dirección opuesta a las manecillas de reloj, la bacteria se mueve de forma impulsada hacia adelante, mientras que su rotación contraria genera un movimiento desordenado (Castro, 2014).

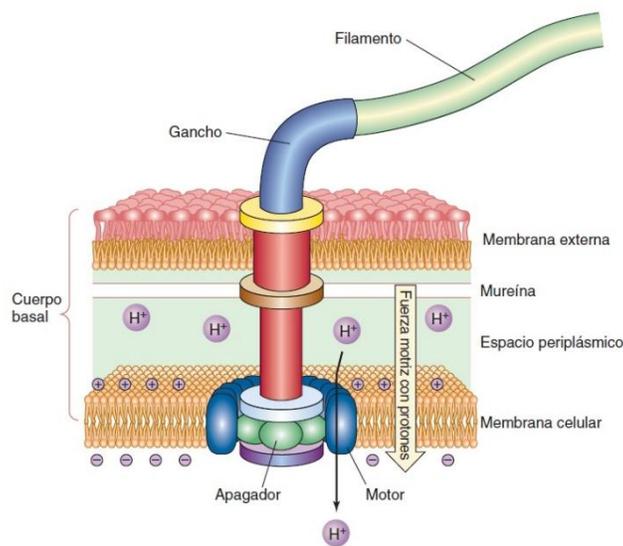


Figura 3. Componentes estructurales del flagelo bacteriano. Representación gráfica de los elementos que componen un flagelo bacteriano. Fuente: Brooks *et al.*, 2011.

Pili y fimbrias. Estructuras más finas y de menor tamaño que los flagelos, y al igual que éstos, se componen por subunidades proteínicas estructurales denominadas pilinas. Algunas pilosidades contienen un tipo especial de pilina en tanto que otras tienen más de una. Las proteínas menores denominadas adhesinas se ubican en la punta de las pilosidades y participan en sus propiedades de unión. La función de los pilis es actuar como órganos de fijación entre células (bacteria – bacteria, bacteria – célula eucariota). Tiene función relacionada a la biopelícula y conjugación (pilis sexuales) (Castro, 2014).

Espora. Estructura formada por algunas especies de bacterias que funcionan como una gran resistencia ante el medio ambiente y agentes nocivos. Las dos más comunes son bacilos Gram positivos: anaerobios obligados del género *Bacillus* y anaerobios obligados del género *Clostridium*. Se desarrolla en condiciones inadecuadas para la supervivencia del organismo mediante un proceso llamado esporulación, y se desecha en condiciones favorables en un proceso llamado germinación (Castro, 2014).

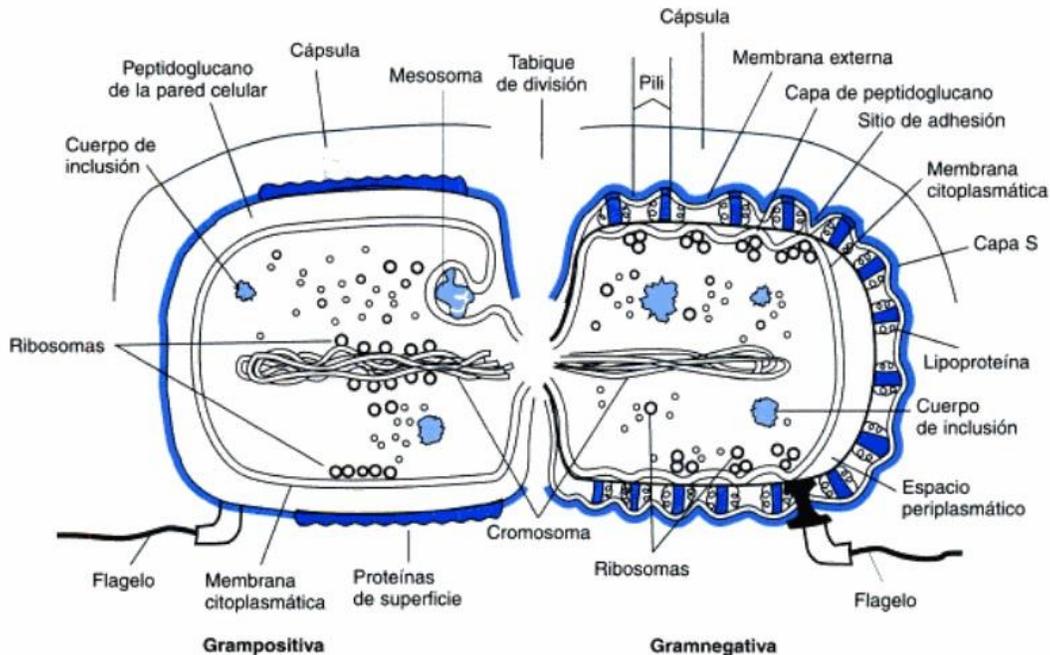


Figura 4. Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. La principal diferencia entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es la composición de su pared celular que proporciona diferentes propiedades y características a cada una. Fuente: Koneman y Allen, 2013.

2.1.2. Genética bacteriana

La genética define y analiza la herencia constante o de los cambios en funciones fisiológicas que constituyen las propiedades de un organismo. La unidad básica de la herencia es el gen, un segmento de DNA que codifica en su secuencia de nucleótidos información para propiedades fisiológicas específicas. En las bacterias los genes se encuentran organizados y empaquetados en el cromosoma bacteriano y en elementos genéticos extracromosomales, como los plásmidos, fragmentos que transportan genes y que son capaces de replicarse independiente, surgen gracias a la acción de enzimas de restricción, proteínas especializadas que cortan en sitios específicos del DNA (Brooks *et al.*, 2011).

El cromosoma típico bacteriano (por ejemplo, *Escherichia coli*) consta de una sola molécula circular y bicatenaria de DNA complementario por las bases nitrogenadas, (A, G, C y T) que suman aproximadamente 5,000,000 de pares de bases, o 5,000 pares de Kb de una longitud de 1.3 mm aproximadamente. Las bacterias sólo poseen una copia de su cromosoma (haploides) a diferencia de las células eucariotas que poseen dos copias diferentes de cada cromosoma (diploides), lo cual propicia en las bacterias una mayor posibilidad de alteraciones en un gen (mutaciones) que tendrá un efecto más evidente en la célula.

El RNA es el encargado de la expresión de los genes codificados a partir del DNA, se encuentra en forma de una sola cadena (monocatenaria) y se conforma similar al DNA excepto que la Timina se sustituye por el Uracilo, formando complemento con la Adenina. Su función más general es la expresión de los genes mediada por la comunicación en forma de mRNA y traducida por los ribosomas (Castro, 2014).

Los promotores y operones son secuencias de nucleótido que controlan la expresión de un gen al determinar las secuencias que se transcribirán en mRNA. Los operones son grupos de uno o más genes estructurales que se expresan a partir de un promotor específico en respuesta a un determinado estímulo y finalizan en el denominado terminador de la transcripción, es decir, que no siempre están activos. Por tanto, todos los genes que codifican las enzimas de una ruta específica pueden regularse de forma coordinada (Murray *et al.*, 2006).

2.1.3. Crecimiento bacteriano

Las bacterias se reproducen de manera asexual por fisión binaria. La célula original se divide en dos células hijas, en el proceso la bacteria se alarga al doble, el cromosoma se replica de manera semiconservativa y se genera una invaginación de la membrana y pared celular que origina una división en la mitad de la célula formando un tabique y así logrando la separación de las células. Al intervalo que transcurre desde una fisión binaria a otra se denomina “tiempo de generación”. En bacterias como *Escherichia coli* el tiempo de generación es de 20 min, mientras que *Mycobacterium tuberculosis* requieren de 12 a 18 h (Castro, 2014).

La curva de crecimiento bacteriano es una representación gráfica del crecimiento de una población bacteriana y se compone por 4 fases:

- **Inicial o latencia (lag).** En esta etapa la bacteria no se divide, reconoce y se adapta al medio, preparando las enzimas y moléculas necesarias para la división celular.
- **Exponencial o logarítmica (log).** División por fisión binaria, cada célula hija da lugar a dos nuevas, aumentando el número de bacterias cada generación de manera exponencial. En esta etapa, las bacterias son más susceptibles a la acción antimicrobiana.
- **Estacionaria.** En esta etapa el crecimiento bacteriano disminuye, ya sea por la falta de nutrientes o debido a la acumulación de desechos.
- **Declive o muerte.** Las bacterias comienzan a morir por falta de nutrientes o efecto de los productos de desecho como ácidos y toxinas.



Figura 5. Curva de crecimiento bacteriano. Representación gráfica de la relación entre número de bacterias en función del tiempo. Fuente: Brooks *et al.*, 2011.

2.1.4. Metabolismo bacteriano

Al igual que los organismos complejos y células eucariotas, las bacterias necesitan moléculas básicas para sobrevivir y mantener su crecimiento continuo. Dichas moléculas básicas son compuestos químicos presentes en el medio conocidas también como nutrientes. Los nutrientes necesarios para la supervivencia pueden clasificarse en 4 tipo:

- Macronutrientes: Carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno
- Micronutrientes: Fósforo, potasio, azufre y magnesio
- Vitaminas y hormonas
- Elementos traza: Zinc, cobre, manganeso, molibdeno y cobalto

El metabolismo se define como el conjunto de reacciones químicas que tienen lugar dentro de la célula y tiene tres funciones principales:

- Obtención y almacenamiento de energía química
- Conversión de nutrientes exógenos a componentes estructurales
- Formar y degradar moléculas necesarias para las funciones celulares específicas

El metabolismo tiene lugar a través de reacciones catalizadas mediante enzimas divididas en dos tipos: anabolismo y catabolismo. El anabolismo o biosíntesis es el proceso por el cual la célula sintetiza sus propios componentes, mientras que el catabolismo es la degradación de nutrientes para la obtención de energía. En la liberación de energía consecuente a los procesos del catabolismo, se utilizan compuestos orgánicos con uniones fosfato para almacenar y transportar la energía. El compuesto para transporte y almacenamiento de energía con mayor importancia para los seres vivos es el ATP, el cual se genera por dos vías en las bacterias, la fosforilación a nivel de sustrato y la fosforilación oxidativa (Montoya, 2008).

La fosforilación a nivel de sustrato frecuentemente se lleva a cabo por la generación de ATP a partir de la incorporación de una molécula de fosfato de alta energía proveniente de un compuesto fosforilado (sustrato) hacia el ADP. Por otra parte, la fosforilación oxidativa se caracteriza por la transferencia de electrones desde compuestos orgánicos hacia un grupo de transportadores de electrones, generalmente moléculas de NAD y FAD para luego atravesar por diversos transportadores hacia moléculas de oxígeno u otras moléculas inorgánicas y orgánicas oxidadas.

La glucosa es el principal es la principal fuente de carbono de muchos seres vivos para iniciar los diferentes procesos metabólicos que llevan a la formación del metabolito clave, el ácido pirúvico o piruvato que puede continuar por dos vías:

- Si hay suficiente presencia de oxígeno es descarboxilado a CO_2 y acetil coenzima A incorporándose al ciclo de Krebs.
- Si no hay suficiente oxígeno el piruvato sigue una ruta anaerobia llamada fermentación con diferentes productos finales de acuerdo a las diferentes rutas y enzimas que pueden intervenir.

La utilización de energía contenida en los nutrientes se produce por reacciones de óxido-reducción, donde la oxidación está definida químicamente por la pérdida de electrones (e^-) y la reducción como la ganancia de los mismos, y en bioquímica se incluyen las transferencias de átomos completos. En bacterias de interés médico los procesos químicos de óxido-reducción incluyen la fermentación y la respiración como principales vías para la obtención de energía. La fermentación se diferencia principalmente por utilizar moléculas orgánicas como aceptores y donadores de electrones, mientras que en la respiración utiliza un aceptor exógeno inorgánico, que en caso de ser oxígeno se conoce como respiración aerobia y al ser un elemento inorgánico como respiración anaerobia (Varela, 2002).

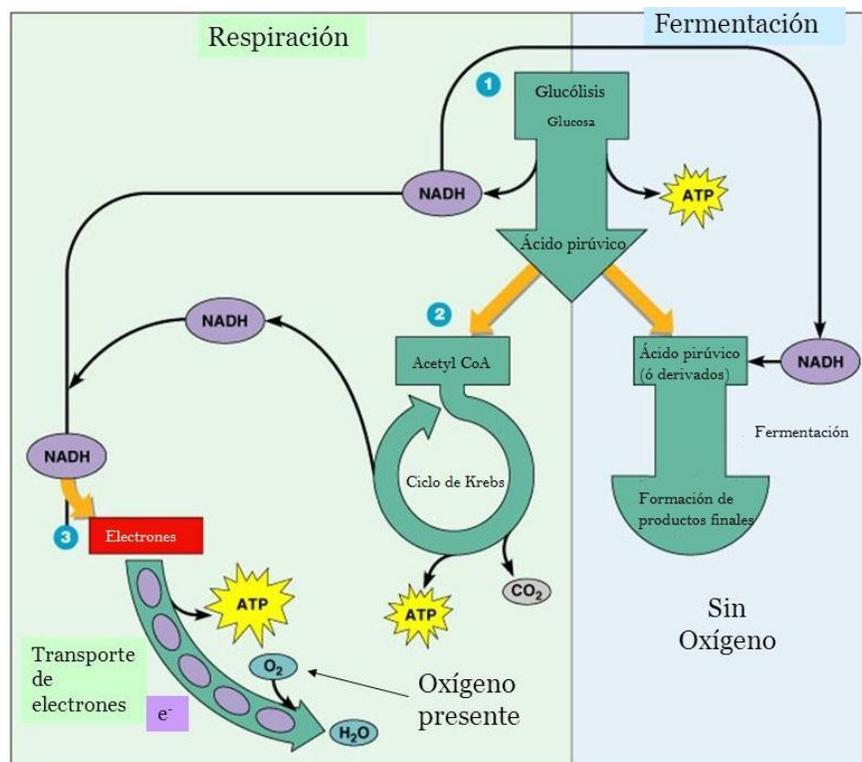


Figura 6. Diferencia entre respiración y fermentación. Representación gráfica de la diferencia que hay entre la obtención de energía mediante respiración celular y la fermentación en las bacterias. Obtenido y modificado de: Benjamin Cummings, Pearson education.

Las bacterias poseen las tres vías centrales del metabolismo de los hidratos de carbono:

- La vía glucolítica o Embden Meyerhof Parnas.
- La vía de pentosa fosfato o shunt de las pentosas.
- La vía de Entner-Doudoroff.

La vía glucolítica es una ruta anaerobia ya que no necesita oxígeno para llevar a cabo la degradación de la glucosa, se puede dividir en tres etapas:

- **Etapa 1.** Formación de 2 intermediarios con tres átomos de carbono cada uno, sin reacciones óxido-reducción ni liberación de energía.
- **Etapa 2.** Reacciones de óxido-reducción con liberación de energía, formando ATP por la vía de la fosforilación a nivel de sustrato (Mediante enzimas) y forma 2 moléculas de piruvato.
- **Etapa 3.** Reacciones de óxido-reducción con formación de productos finales de la fermentación, variando dependiendo la bacteria.

Por cada molécula de glucosa se forman 4 moléculas de ATP, y se descargan 2 dado que la primera etapa de la fermentación consume 2 moléculas de ATP, dejando en balance neto 2 moléculas de ATP por cada glucosa fermentada.

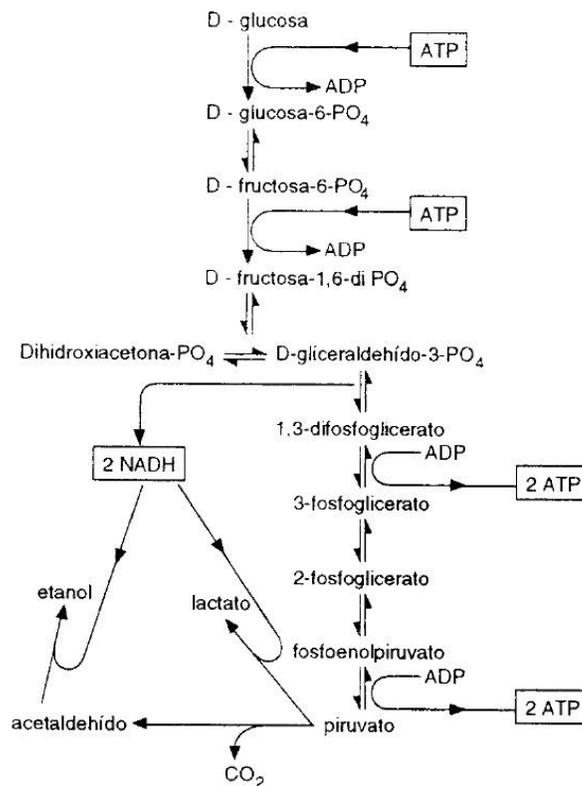


Figura 7. Esquema de la fermentación. Proceso de degradación que sufre la glucosa para producir piruvato y posteriormente la formación de etanol o lactato de acuerdo al tipo de fermentación que se realice. Fuente: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>

Fecha de consulta: 30 de Mayo 2019.

La vía de las pentosas fosfato es una alternativa multifuncional a la vía glucolítica en donde se degradan no solo hexosas (ej., glucosa), sino también pentosas y otros hidratos de carbono. Para los fermentadores heterolácticos es la principal vía para producir energía, aunque la mayoría de las bacterias la utilizan como fuente de NADPH o para la síntesis de nucleótidos.

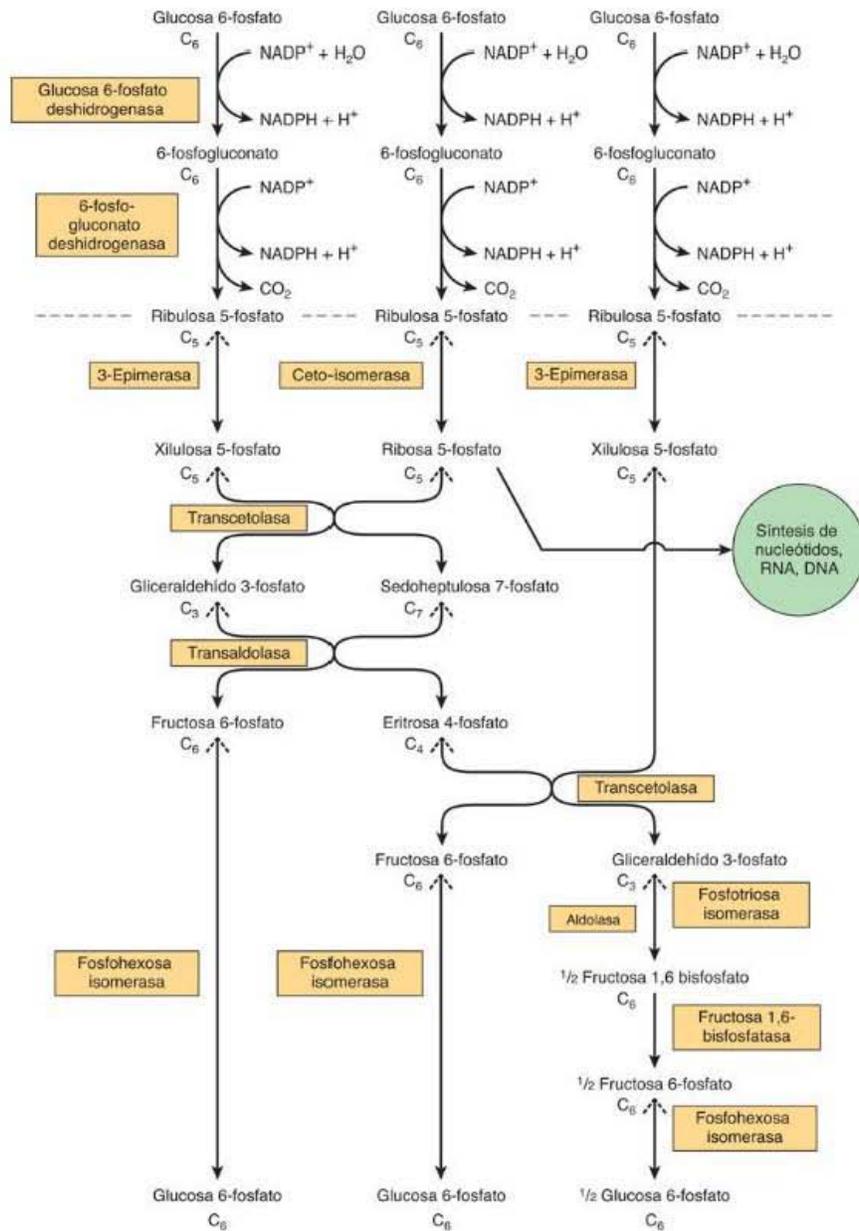


Figura 8. Vía de las pentosas fosfato. Esquema de las rutas que siguen las pentosas para la formación de ácidos nucleicos. Fuente: Murray *et al*, 2013.

La vía de Entner-Doudoroff es una ruta metabólica alternativa a la vía glucolítica donde requiere oxígeno para catabolizar la glucosa, se realiza con diferentes enzimas y es la vía principal para la obtención de energía en bacterias aerobias estrictas como *Neisseria* y *Pseudomonas*. Al igual que en la ruta de pentosas, sólo se obtiene una molécula de ATP por glucosa degradada (Varela, 2002).

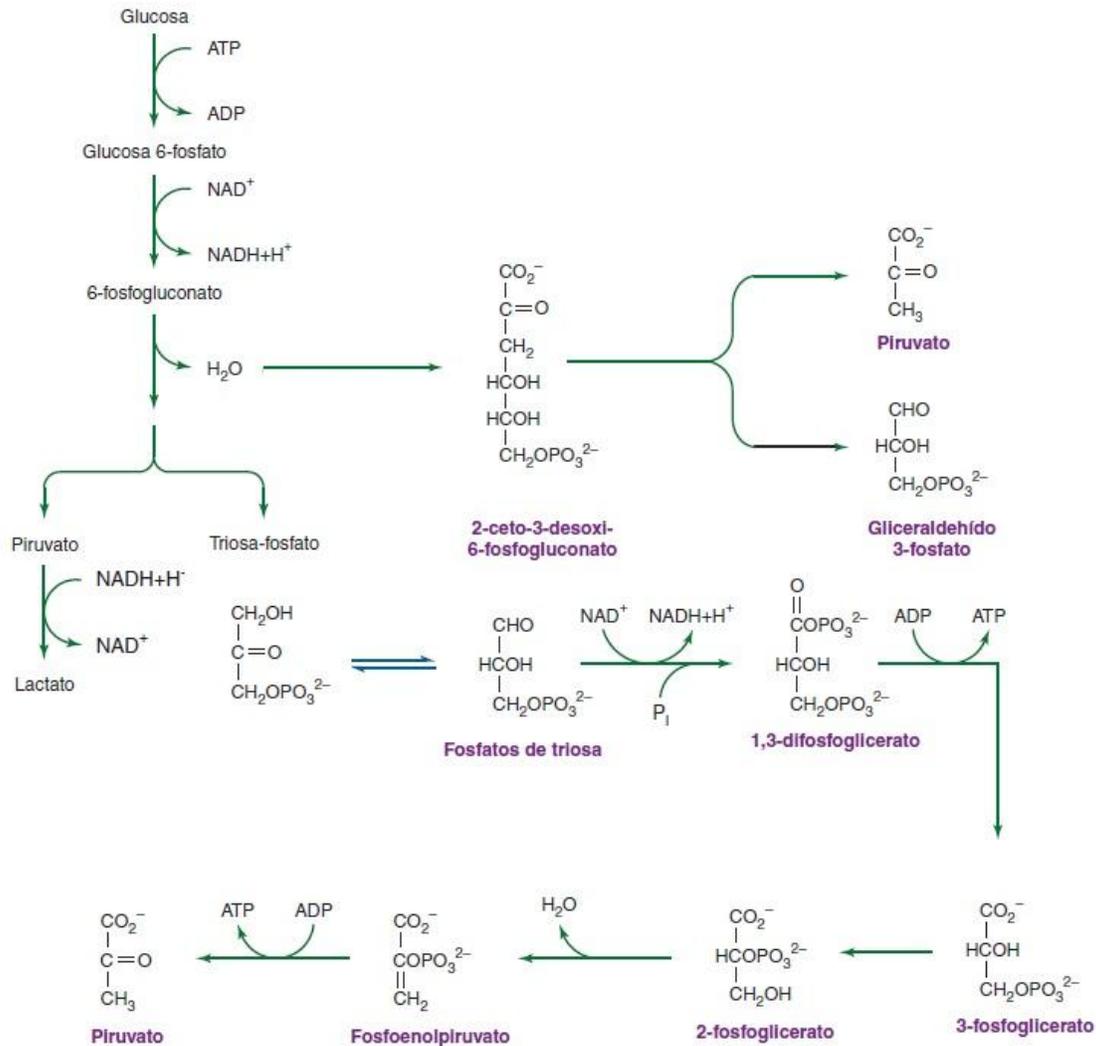


Figura 9. Vía de Entner-Doudoroff. Ruta de Entner-Doudoroff alterna para la obtención de energía. Adaptado de: Brooks *et al.*, 2011.

2.2. El género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, la cual es un grupo heterogéneo y extenso de bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales, también pueden ser aisladas de suelo y agua. Además de *Klebsiella*, esta familia comprende muchos géneros, tales como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, ente otros. Las enterobacterias son anaerobios o aerobios facultativos, fermentadores de varios carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja, además de ser productores de diversas toxinas, así como otros factores de virulencia (Brooks *et al.*, 2011).

La taxonomía de las Enterobacterias es compleja y variable por lo cual se han definido más de 50 géneros; sin embargo, las enterobacterias de importancia clínica comprenden de 20 a 25 especies. El género *Klebsiella* recibe su nombre en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs. Los bacilos que ahora conocidos como *Klebsiella* también fueron descritos por Carl Friedlander quién, y por muchos años lo nombró el como “el bacilo de Friedlander” asociado a neumonías severas, en muchos casos fatales.

En 2001 se realizó la comparación de secuencias de rRNA de 16S y genes *rpoB* (que codifican la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana) de 9 especies de *Klebsiella*. Se demostró que *Klebsiella* es heterogénea, compuesta por especies que forman tres agrupamientos filogenéticos:

- Grupo I: *K. pneumonie pneumoniae*, *K. pneumonie rhinoscleromatis*, *K. pneumonie ozaenae* y *K. granulomatis*.
- Grupo II: *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* y *K. terrigena*.
- Grupo III: *K. oxytoca*.

Con base en las evidencias se propuso dividir al género *Klebsiella* en dos géneros: *Klebsiella* con el grupo I y *Raoultella* (En honor al bacteriólogo francés Didier Raoult) con el grupo II, dejando a *K. oxytoca* como un taxón monofilético. A su vez, Drancourt y colaboradores demostraron que *K. oxytoca* está dividido en dos grupos genéticos, denominados oxi-1 y oxi-2.

Las especies de *Klebsiella* están ampliamente distribuidas en el ambiente y es un saprófito natural del tracto gastrointestinal y nasofaríngeo en humanos y animales. Sin embargo, también se considera un organismo oportunista, al ser uno de los microorganismos aislados con mayor frecuencia de infecciones del tracto urinario y respiratorio, así como en casos de bacteriemia y sepsis neonatal, entre otras.

Se debe sospechar de este género cuando se recuperan colonias grandes de color amarillo claro y consistencia mucosa en aislamiento primario. Sobre agar McConkey, aparecen colonias grandes, mucoides y rojizas, lo que indica fermentación de la lactosa y producción de ácido, aunque la fermentación puede no ser muy evidente antes de las 24 hrs del cultivo (Koneman Y Allen, 2013; Singh *et al.*, 2016).



Figura 10. Cultivo de *Klebsiella oxytoca*. Cultivo de una cepa de *Klebsiella oxytoca* en agar sangre, se pueden observar colonias mucosas de color claro. Fuente: <https://es.123rf.com>
Fecha: 30 de Mayo 2019.

Los miembros que conforman el género *Klebsiella* tienen forma de bastón que oscilan entre 1 y 3 μm , son anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles, oxidasa negativos, fermentadores de glucosa, reducen nitritos a nitrato y la mayoría no descarboxilan la ornitina, hidrolizan la urea lentamente, y producen un color rosado pálido en la superficie inclinada del agar urea de Christensen. La producción de indol a partir de triptófano puede usarse para separar las dos especies principales: *Klebsiella pneumoniae* es indol negativo y *Klebsiella oxytoca* es indol positivo. Ciertas cepas no producen estas reacciones clásicas, lo cual conduce al nombramiento de varias especies adicionales (Brooks *et al.*, 2011; Puerta y Mateos, 2010).

2.2.1. Factores de virulencia de *Klebsiella*

Las bacterias del género *Klebsiella* poseen diversos factores de virulencia, entre los que destacan la cápsula, las fimbrias, el lipopolisacárido y los sideróforos. En este contexto, las especies de *Klebsiella* poseen los antígenos “O” y “K”, los cuales corresponden al lipopolisacárido y a la cápsula, respectivamente.

Fimbrias. Las proyecciones permiten una mayor proximidad de la *Klebsiella* a las células del hospedero y adherirse a las mismas (Martínez, 2018).

Adhesinas. Generalmente compuestas por lectinas (proteínas con afinidad a azúcares), su función le permite a la *Klebsiella* mejor adherencia a las células del hospedero. En algunos casos la fimbria posee dos o más adhesinas distintas para dos o más receptores diferentes y se les conoce como adhesinas fimbriales. Las adhesinas no unidas a fimbrias se conocen como adhesinas afimbriales por ejemplo: las proteínas de membrana externa en bacterias Gram negativas, ácidos lipoteicoicos en Gram positivas, glucocalix, proteínas F y M de *Streptococcus sp* (Molina, 2017).

Cápsula. La cápsula constituye el llamado antígeno “K” es una de las principales características del género *Klebsiella* que le confiere una amplia resistencia. Se compone de una red de polímero que cubre la superficie. En su mayoría está compuesta de polisacárido el cual es conocido como cápsula cuando forma una capa homogénea y uniforme, cuando forma una red de trabéculas o una malla alrededor de la bacteria se conoce como glicocálix. La cápsula tiene como función proteger a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedador, es decir, evade la activación del complemento y por lo tanto la fagocitosis al disminuir las probabilidades de ser opsonizada por la C3b (Molina, 2017). Se conocen 72 polisacáridos diferentes que conforman la cápsula, los cuales originan los diferentes serotipos (Romero, 2007).

Lipopolisacárido (LPS). Constituye el antígeno O y la endotoxina de *Klebsiella* y demás bacterias Gram negativas. Facilita la adherencia en el proceso inicial y confiere la resistencia al microorganismo contra la actividad bactericida del suero, haciendo difícil el tratamiento para infecciones por *Klebsiella*. Están localizados en la membrana externa de la envoltura celular bacteriana y juegan un papel de importancia en la patogénesis de las infecciones bacterianas, así como en la interacción con el hospedero y el sistema inmune. Se compone por una porción lipídica muy conservada denominada lípido A, el cual se encuentra inmerso en la cara externa de la membrana externa de la bacteria, y una porción hidrofílica compuesta por azúcares que presentan una gran variedad estructural. Provoca la actividad de los macrófagos e induce una respuesta inflamatoria con un efecto pirogénico (Molina, 2017).

Sideróforos. Son moléculas que presenta una alta afinidad por el hierro (Fe), que funciona como catalizador de reacciones de óxido-reducción de proteínas que participan en el transporte de electrones y de oxígeno, sin embargo, en el organismo del hospedero éste se encuentra extremadamente en bajas cantidades, por lo que, para asegurar la obtención de este elemento, *Klebsiella spp* secreta moléculas sideróforos, los cuales lo capturan de las proteínas quelantes de Fe o lo adquieren del ambiente durante el proceso infeccioso.

La aerobactina, la enterobactina y la yersiniobactina son los sideróforos de mayor importancia en este género bacteriano, los cuales le proporcionan la capacidad para replicarse y mantener una infección local o sistémica (Podschun y Ullmann, 1998).

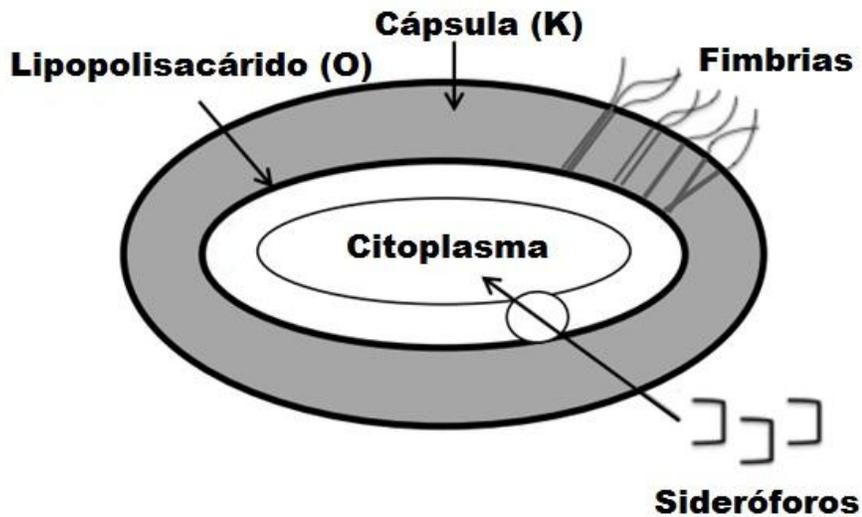


Figura 11. Factores de virulencia en *Klebsiella* spp. Los principales factores de virulencia que presentan las especies de *Klebsiella* son: cápsula, fimbrias, lipopolisacárido y sideróforos. Adaptado de Podschun y Ullman, 1998.

2.3. *Klebsiella oxytoca*

Klebsiella oxytoca es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo, no móvil perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Tiene su temperatura de crecimiento se encuentra entre 10° y 44°C. Es ubicua en medio ambiente y se puede cultivar a partir de piel, membranas mucosas, orofaringe y de tracto intestinal tanto de humanos como de animales. En humanos se cultiva a partir de heces en un 8 a 10 % de adultos sanos (Darby *et al.*, 2014).

La especie *Klebsiella oxytoca* se encuentra principalmente asociada a infecciones urinarias, también en algunos casos de bacteriemias, choque séptico acoplado a órganos sistémicos e incluso casos graves que llevan a la muerte, por ello es considerada como causante de enfermedades de importancia intrahospitalaria. El 50 % de las cepas de *Klebsiella oxytoca* han sido remitidas a los CDC a partir de muestras de heces, seguidas de muestras sanguíneas, orina y líquido cefalorraquídeo. Se tiene como principal aislamiento muestras de tracto respiratorio. En 2006 fue reportada por primera vez como causante del síndrome de colitis hemorrágica asociada al uso de antibióticos con lo cual se ha visto un incremento en la frecuencia de los casos de dicho síndrome (Nagamura *et al.*, 2009; Koneman y Allen, 2013).

Es considerado un patógeno oportunista y reconocido clínicamente como una bacteria de importancia clínica asociado a infecciones intrahospitalarias en pacientes que incluyen niños y neonatos. Su importancia crece al poseer mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos incluyendo la producción de espectro extendido de β -lactamasas, las cuales hidrolizan el anillo betalactámico de las penicilinas. Además de la resistencia natural a la ampicilina y a la carbenicilina, la adquisición de creciente de plásmido R dota a la bacteria de resistencia a cefalosporinas y aminoglucósidos (Singh *et al.*, 2016).

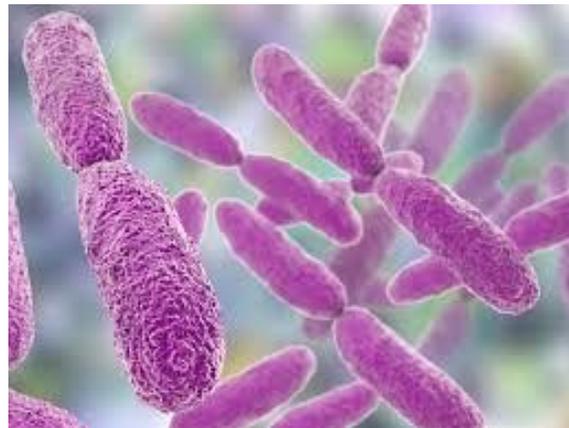


Figura 12. *Klebsiella oxytoca*.
 Micrografía de *Klebsiella oxytoca*, bacteria en forma de bacilos.
 Fuente: <https://www.hospimedica.es>

2.3.1. Taxonomía e identificación de *Klebsiella oxytoca*

Las categorías taxonómicas de *K. oxytoca* son mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Klebsiella oxytoca*. Clasificación y nombre que recibe la taxonomía de *Klebsiella oxytoca*.
 Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 Con número de identificación 883116

Jerarquía taxonómica	
Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>oxytoca</i>

En las pruebas primarias se encuentra como bacilo Gram negativo, inmóvil, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobia facultativa. Las pruebas bioquímicas secundarias para la identificación de la especie *Klebsiella oxytoca* se diferencian principalmente de la producción de indol positivo.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas para especies del género *Klebsiella*. Comparación de pruebas bioquímicas para la identificación de *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae*. Tomado de MacFaddin, 2003.

	KIA	GAS	H ₂ S	RM	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOV	LIS	ARG	ORN	ONPG	MIO
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A	++	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-,-,-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	A/A	++	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-,+,-

KIA: Agar Hierro de Kliger, **GAS:** Producción de gas, **H₂S:** Ácido sulfhídrico, **RM:** Rojo de metilo, **VP:** Voges Proskauer, **IND:** Indol, **CIT:** Citrato, **PAD:** Fenilalanina desaminasa, **URE:** Urea, **MOV:** Movilidad o motilidad, **LIS:** Lisina, **ARG:** Arginina, **ORN:** Ornitina, **ONPG:** Orto Nitro Fenil Galactopiranosido, **MIO:** Motilidad Indol Ornitina.

2.4. Toxina tilivalina

La tilivalina es una enterotoxina no ribosomal con acción citotóxica y la primera PBD natural vinculada a enfermedad en intestino humano. Se ha demostrado la acción citotóxica de la toxina en cultivo de líneas celulares Hep-2 y HeLa, provocando apoptosis e interrupción en la función de barrera en el epitelio intestinal usando modelos animales, así como la patogénesis de colitis hemorrágica asociada al uso de antibióticos en humanos (Schneditz *et al.*, 2014; Dorsnich *et al.*, 2017).

Tabla 3. Características de la tilivalina.

Características moleculares de la tilivalina.

Fuente: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tilivalline>

Características
Nombre trivial: tilivalina
Nombre IUPAC: (6S,6aS)-4-hydroxy-6-(1H-indol-3-yl)-5,6,6a,7,8,9-hexahydropyrrolo[2,1c][1,4]benzodiazepin-11-ona
Fórmula molecular: C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₂
Peso molecular: 333.391 g/mol

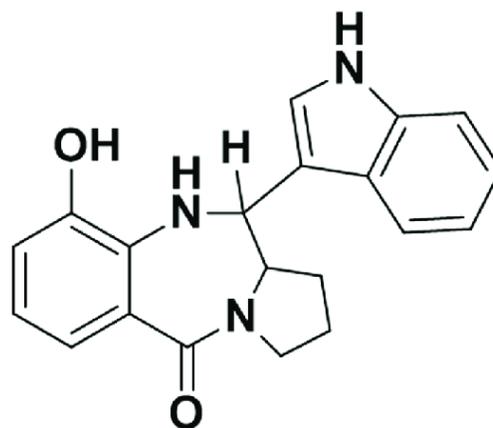


Figura 13. Tilivalina. Estructura química de la toxina tilivalina.

Fuente: Darby *et al.*, 2014.

2.4.1. Organización genética

La tilivalina es un péptido no ribosomal, es decir, no es producido por los ribosomas y, por tanto, no está conformado por aminoácidos ni presenta enlaces peptídicos. Su síntesis está mediada por NRPS's, las cuales son un conjunto de enzimas multifuncionales que se encuentran codificadas en operones dentro de una isla de patogenicidad (Schneditz *et al.*, 2014).



Figura 14. Isla de patogenicidad de la tilivalina. Organización genética de componentes involucrados en la biosíntesis de la tilivalina. Cada operón está representado por un color diferente, las flechas indican el marco de lectura. Modificado de Schneditz *et al.*, 2014.

Tabla 4. “Clúster” genético de la isla de patogenicidad de la tilivalina. Nombre y función de cada uno de los genes codificados en la isla de patogenicidad asociado a la biosíntesis de la tilivalina. Tomado de Tse *et al.*, 2017.

Gen	Función
<i>nac</i>	Regulador transcripcional
<i>cbl</i>	Regulador transcripcional
<i>erfK</i>	Transpeptidasa
<i>gst</i>	Glutación S-transferasa
<i>gcvA</i>	Regulador transcripcional
<i>mfsX</i>	Permeasa
<i>uvrX</i>	Trasportador tipo ABC
<i>hmoX</i>	Antranilato 3-monooxigenasa
<i>adsX</i>	Antranilato sintasa
<i>imcX</i>	Isocorismatasa sintasa
<i>dhbX</i>	2,3-DHM deshidrogenasa
<i>aroX</i>	DAHP sintasa (Clase II)
<i>npsA</i>	NRPS, homólogo de TomA
<i>tdhA</i>	Fragmento de NRPS
<i>npsB</i>	NRPS, homólogo de TomB
<i>marR</i>	Regulador transcripcional

2.4.2. Biosíntesis

La biosíntesis de la tilivalina comienza con el operón *aroX*, el cual se encuentra formado por 5 genes que codifican para la producción del sustrato antranílico a través de enzimas relacionadas con la vía del shikimato y el corismato. AroX actúa sobre el fosfoenolpiruvato y la 4-eritrosa-4-fosfato formando así la 3-desoxi-D-arabinosa-heptulosa-7-fosfato que, en conjunto con AroB que se compone por enzimas de la vía del shikimato, promueven la síntesis de corismato. El corismato se convierte a 2-amino-2-desoxi isocorismato (ADIC) por acción de la enzima AdsX.

A partir de este punto se tiene dos vías para la conversión al ácido-3-hidroxiantranílico (3HAA); la primera es mediante la síntesis del ácido trans-2,3-Dihidro-3-hidroxiantranílico (DHHA) por la enzima lcmX y posteriormente al ácido 3-hidroxiantranílico por la enzima DhbX y la segunda mediante la formación de ácido antranílico desconociendo la enzima efecto de dicho paso y posteriormente a la formación del ácido 3-hidroxiantranílico por la enzima HmoX.

A continuación, el complejo NpsA/ThdA acepta al ácido 3-hidroxiantranílico y el complejo NpsB a la L-prolina, resultando en el ataque nucleofílico de la L-prolina sobre el antranilato y, mediante la liberación reductiva se forma la N-acilprolina, que al ciclarse forma el precursor de la tilivalina llamado Tilimicina (Dornisch *et al.*, 2017).

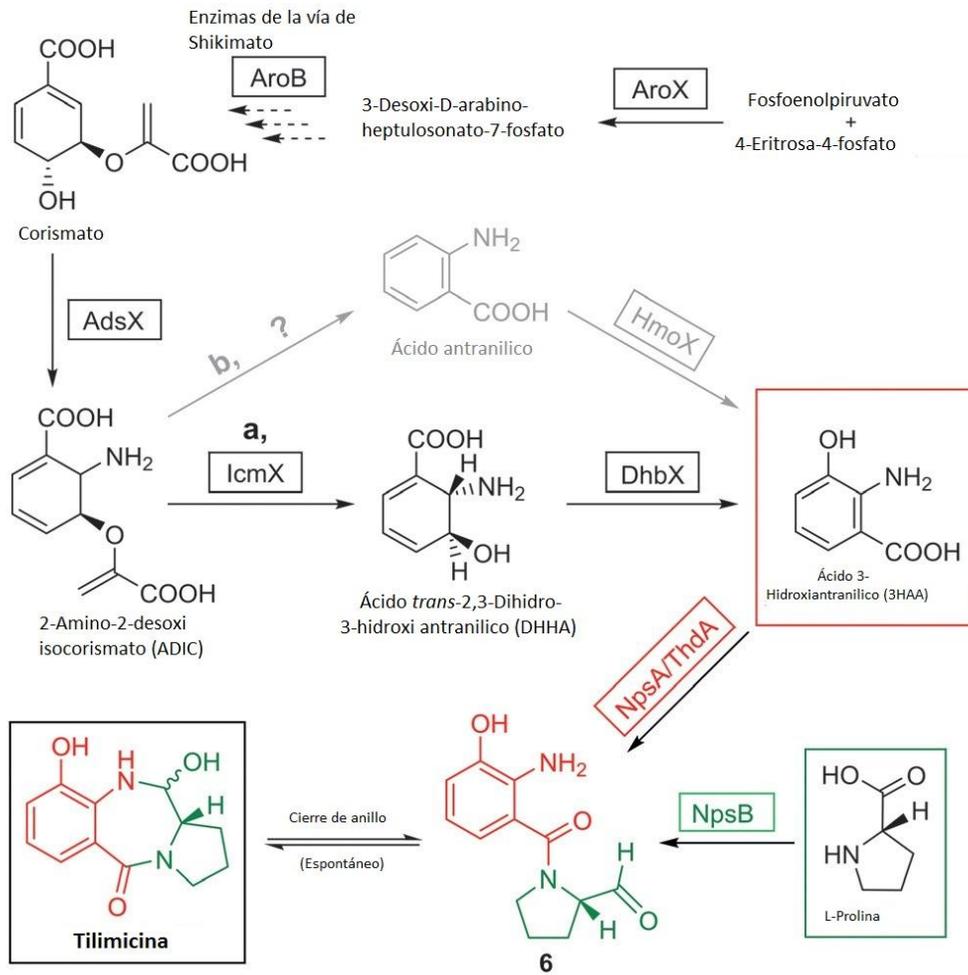


Figura 15. Biosíntesis de la tilimicina. Propuesta del mecanismo de biosíntesis del precursor de la tilivalina. Modificado de Dornisch *et al.*, 2017.

La tilimicina libera una molécula de agua para estabilizar el doble enlace del grupo amino con el carbono, el cual surge un ataque nucleofílico por parte del indol que procede de la degradación de L-triptófano por la enzima TnaA, finalizando en la síntesis de la tilivalina (Dornisch *et al.*, 2017).

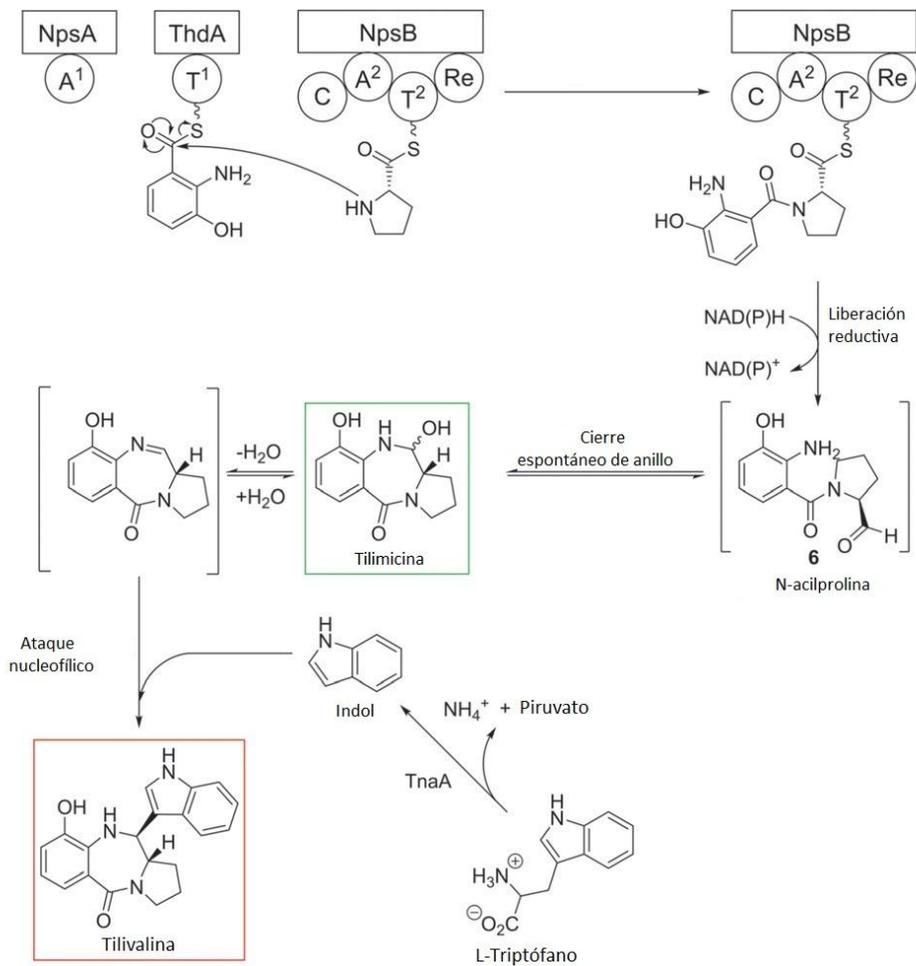


Figura 16. Biosíntesis de la tilivalina. Propuesta del mecanismo de biosíntesis de la tilivalina a partir de la formación de tilimicina y la incorporación de indol. Modificado de Dornisch *et al.*, 2017.

2.5. Fundamento de las técnicas utilizadas

2.5.1. Cultivo bacteriano

Los medios de cultivo son uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos mediante su observación en un entorno artificial que contenga los medios adecuados para su proliferación. El cultivo es el proceso de proliferación de microorganismos al proporcionarles un entorno con condiciones apropiadas. Los microorganismos en proliferación producen réplicas de sí mismo y necesitan los elementos presentes en su composición química. Los nutrientes deben proporcionar estos elementos de forma accesible desde el punto de vista metabólico. Además, los microorganismos requieren energía metabólica para sintetizar macromoléculas y mantener gradientes químicos esenciales a través de sus membranas. Los factores que deben controlarse durante la proliferación incluyen nutrientes, pH, temperatura, aireación, concentración de sales y fuerza iónica del medio (Brooks *et al.*, 2011).

Los medios de cultivo pueden dividirse en diferentes tipos con base en la función que desempeña:

- Selectivos.
- Diferenciales.
- Selectivo-Diferenciales.
- De mantenimiento.

Y de acuerdo a su estado físico:

- Líquidos.
- Semisólidos.
- Sólidos.

Caldo de Lisogenia. Es un medio nutricional enriquecido utilizado para el crecimiento general de bacterias. Es conocido erróneamente como caldo de Luria, caldo de Lennox o medio Luria Bertani. Según su creador Giuseppe Bertani, esto se debe a un error en abreviatura que realmente significaba caldo lisogenia.

La fórmula generalmente se diferencia en la cantidad de cloruro de sodio, proporcionando la selección de las condiciones osmóticas apropiadas para la tensión bacteriana particular y condiciones deseadas, manteniendo el equilibrio osmótico. La peptona de caseína y el extracto de levadura proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano. Los componentes del medio de cultivo son los siguientes:

- Peptona tríptica de caseína: 10 g/L
- Extracto de levadura: 5 g/L
- NaCl: 10 g/L

La preparación consiste en disolver 25 g del polvo en un litro de agua destilada, ajustando a un pH de 7.2. Esterilizando en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

Caldo Triptona-Soya. Es un medio líquido para enriquecimiento de uso general utilizado en procedimientos para pruebas generales de esterilidad y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes en exceso. Los digeridos enzimáticos de caseína y harina de soya proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas. La glucosa es utilizada como fuente de energía. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico y el fosfato potásico dibásico actúa como amortiguador para controlar el pH. Los componentes del medio de cultivo son los siguientes:

- Digerido pancreático de caseína: 17 g/L
- Digerido péptico de harina de soya: 3 g/L
- Glucosa (dextrosa): 2.5 g/L
- Cloruro de sodio: 5 g/L
- Fosfato dipotásico de hidrógeno: 2.5 g/L

La preparación consiste en disolver 25 g del medio en un litro de agua destilada, ajustando a un pH de 7.2. Se esteriliza por autoclave durante 20 minutos a 121°C.

2.5.2. Extracción de material genético

El RNA se encuentra en mayor abundancia dentro de la célula, cerca de 10 veces más que el DNA. El azúcar que compone el RNA es la ribosa, que posee un grupo hidroxilo libre en la posición 2'. Este grupo participa en la formación de intermediario en el mecanismo de hidrólisis y determina la inestabilidad química del RNA. Los puntos principales de la extracción de ácidos nucleicos comienzan por separar el material genético (DNA o RNA según sea el caso) de otros componentes celulares como proteínas, lípidos, etc.

En segundo lugar, es evitar la fragmentación de las moléculas como consecuencia de la ruptura mecánica o acción de nucleasas endógenas o exógenas (DNasas o RNasas). Además de la fragilidad del RNA también se debe tomar en cuenta la presencia de enzimas que puedan afectar, como las RNasas, por lo que la extracción se lleva a cabo a bajas temperaturas para mantener la inactivación de dichas enzimas (Salazar *et al.*, 2013).

La ruptura de la membrana celular se puede llevar a cabo por métodos físicos (presión usando la prensa de French, sonicación o con mortero) o métodos químicos (detergentes como SDS, CTAB, etc.; en bacterias Gram positivas con lisozimas, EDTA, levaduras con tratamiento lítico o zimolasa y plantas con tratamiento de celulosa). El método de elección más frecuente es el uso de detergentes iónicos como el SDS que se une a los residuos de los aminoácidos causando cambios en la conformación de la proteína. Tras la ruptura de la cubierta celular, la muestra es centrifugada para separar los restos celulares de los componentes de importancia, rescatando el sobrenadante que contiene los ácidos nucleicos de interés y restos proteínicos que deberán ser eliminados (Jimenez, 2003).

La eliminación de proteínas se puede realizar por “Salting out” (expulsión de proteínas efecto de la interacción hidrofóbicas en altas concentraciones de sal), unión selectiva de ácidos nucleicos a soportes sólidos (sílica) y extracción orgánica, la cual se divide en dos tipos de acuerdo a su blanco:

- Fenol saturado en buffer ácido para purificar y extraer RNA
- fenol saturado en buffer básico para DNA.

Los ácidos nucleicos son polares, propiedad dada por el grupo fosfato con carga negativa, lo que permite su insolubilidad en solventes orgánicos y solubilidad en solventes polares, como H₂O. Las proteínas son residuos no polares que en solución acuosa permanecen inmersas en la muestra, pero en un solvente menos polar pasan hacia el exterior (desnaturalización) y pasan a ser más solubles en la fase orgánica (Zavala, 2005).

Se obtiene la fase acuosa de la muestra correspondiendo a la fase superior que contiene los ácidos nucleicos y se desecha la fase orgánica con los residuos de proteína mediante la centrifugación donde la fase orgánica queda al fondo con una capa intermedia de proteínas. Dado que en soluciones acuosas se forma una capa hidratante alrededor del ácido nucleico.

En presencia de etanol absoluto, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfatos, que bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ácido nucleico precipite y con mejor eficiencia a bajas temperaturas. El uso de etanol 70 % permite el lavado de las sales contenidas. Finalmente, para su almacenamiento se recomienda su resuspensión en agua DEPC o un buffer ligeramente básico para evitar la depurinación y acción de RNAsas. El EDTA quelata a los iones Mg^{2+} ayudando a mantener a las RNAsas inactivas. Se puede conservar a 4 °C. Por períodos prolongados es preferible hacerlo a -20 °C o -80 °C. Para terminar la extracción se realiza la purificación del RNA mediante el uso de enzimas específicas DNAsas para contener RNA puro en la muestra y evitar otras interferencias al momento de cuantificar la muestra (Salazar *et al.*, 2013).

2.5.3. Cuantificación del material genético

Los ácidos nucleicos poseen la propiedad de absorber de manera eficiente la luz ultravioleta gracias a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de la cadena. Tienen un máximo de absorción a 260 nm de longitud de onda, por lo tanto, la absorción será proporcional a la concentración de ácido nucleico presente en la muestra.

Las proteínas tienen un máximo de absorción de 280 nm (principalmente los residuos de triptófano), las lecturas a dicha longitud de onda pueden mostrar si existe residuos de contaminante proteico realizando el cálculo con la relación de absorbancias 260/280 para expresar la pureza del DNA. Dependiendo la composición nucleica aproximada de 1.8 se considera una muestra de DNA puro, mientras que, para el RNA, una relación de 2.0 se considerado como muestra pura. Los residuos de RNA pueden interferir cuando se busca aislar DNA puro, y viceversa, por lo cual se recomienda realizar tratamientos con DNAsas o RNAsas según sea el caso (Puerta y Urueña, 2009).

2.5.4. Caracterización o integridad del DNA

Para llevar a cabo la evaluación de la integridad se realiza una electroforesis para ácidos nucleicos en ésta técnica se permite la separación de moléculas de DNA o RNA con base en su tamaño o conformación al ser sometidos al arrastre a través de un gel de agarosa o poliacrilamida y un campo eléctrico que permite su movilidad mediante la atracción de cargas de los ácidos nucleicos. Dicha separación se hace bajo condiciones de amortiguamiento con buffer o tampón TAE o TBE. Para la separación de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis éstas moléculas migran hacia el polo positivo (Voet, 2009).

La agarosa es un polímero lineal formado por residuos de D- y L-galactosa alternados. Las cadenas de agarosa forman fibras helicoidales que se agrupan en estructuras unidas con radios de 20 a 30 nm de diámetro. La gelificación de la agarosa produce una malla tridimensional con canales de 50 a más de 200 nm de diámetro. Se pueden encontrar diferentes tipos de agarosa como la agarosa estándar, con alta temperatura de fusión para analizar fragmentos de 1 a 25 kb y de baja temperatura de fusión, cerca de los 65°C para recuperación rápida de fragmentos de DNA con mayor eficiencia. La visualización del DNA o RNA se lleva a cabo mediante tinción con colorantes intercalantes de fluorescencia permitiendo detectar bandas con cantidades de DNA tan pequeñas como 1 a 10 ng (Salazar *et al.*, 2013).

2.5.5. PCR

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica molecular que aprovecha la actividad enzimática de la DNA polimerasa para amplificar millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos de variación de temperatura repetidos en donde la secuencia seleccionada es copiada fielmente. Con el paso del tiempo, se han ido desarrollando diferentes tipos de PCR, por ejemplo, al tratarse del DNA como sustrato blanco de la amplificación, se habla típicamente de una PCR común, en cambio, cuando el sustrato es cDNA, el cual proviene del mRNA se le conoce como PCR Transcriptasa Reversa, RT-PCR, la cual consigue la conversión mediante la incorporación de la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el mRNA en cDNA.

Los elementos de mayor importancia para llevar a cabo la técnica son: el templado o molde (DNA o cDNA), la enzima DNA polimerasa, los oligonucleótidos o “primers” en algunos casos, los dNTPs, el ión magnesio (Mg^{+}), solución amortiguadora o buffer y H_2O . Dichos elementos interactúan en tres etapas principales del proceso que compone la PCR que son:

- **Desnaturalización.** Las cadenas de DNA son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20 a 30 segundos; el tiempo depende de la secuencia de templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper las uniones conformados por tres enlaces, uno más comparado al enlace A-T.
- **Hibridación.** Alineación de los oligonucleótidos al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Es importante para la hibridación con los oligonucleótidos que la temperatura de alineamiento o T_m sea óptima, rondando entre los 50 a 60°C.

- Extensión.** Etapa en que la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-oligonucleótidos y empieza su función catalítica a una alta velocidad; los dNTP's complementarios son incorporados para crear las cadenas completas de DNA. La extensión de la cadena se realiza en dirección 5' a 3'. La temperatura óptima de para la reacción es de 72°C, ya que es la temperatura donde la enzima es funcional (Tamay, 2013).

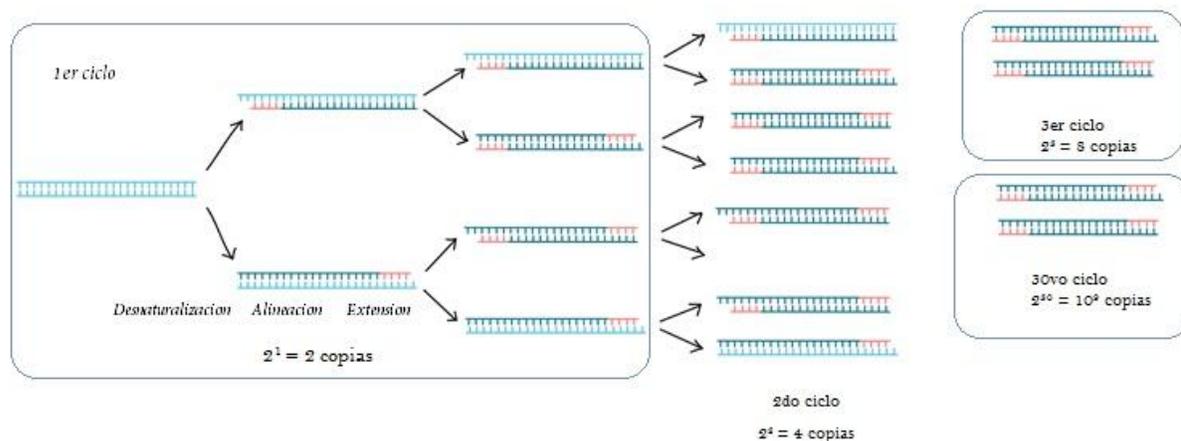


Figura 17. PCR. Representación gráfica del proceso que síguela amplificación de una secuencia en PCR. Adaptado de: <https://es.khanacademy.org> Fecha de consulta: 30 de Mayo 2019.

Con el paso del tiempo, la técnica se ha ido mejorando y adaptando a las necesidades de investigación, desarrollando nuevas y mejores técnicas de PCR, así como los equipos encargados de procesar las muestras.

Tabla 5. Tipos de PCR. Nombre y fundamento de las variantes más utilizadas de PCR.

Tipos de PCR	Fundamento
PCR común	Amplificación de secuencias de DNA
PCR anidada (nested)	Amplificación de una secuencias de DNA previamente amplificada
RT-PCR	Amplificación del DNA partiendo de secuencias de RNA utilizando una enzima de transcripción reversa (RT)
PCR múltiple	Amplificación de diferentes secuencias de forma simultánea
qPCR	Amplificación y cuantificación simultánea de la secuencia amplificada
PCR "in situ"	Amplificación en secciones histológicas o celulares.

2.5.5.1. qPCR

La qPCR o PCR en tiempo real lleva a cabo la detección de los productos de la amplificación que sucede durante cada ciclo de la reacción junto a la cuantificación de la cantidad de DNA presente en la muestra. La nomenclatura que se usa también difiere si se utiliza DNA genómico, entonces se hablará de una qPCR, por el contrario, si se obtiene antes el cDNA y luego se realiza la PCR, nos referimos a una RT-qPCR con lo cual es posible cuantificar la cantidad de mRNA relativa de una muestra. Dicha cuantificación es denominada relativa, ya que se compara entre diferentes muestras (tejidos, tratamientos, “time-points”, etc.) la cantidad relativa o relación del mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo (control endógeno) (Tamay, 2013). Para la cuantificación se mide en cada ciclo la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa. Los sistemas de PCR en tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo mientras el “software” de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de DNA/RNA iniciales, de forma que, en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

La gráfica demuestra la detección de fluorescencia en una PCR en tiempo real, donde el eje vertical contiene los valores de fluorescencia relativa detectados y el eje horizontal el número de ciclos. El umbral representa el tiempo de fluorescencia sin cambios (basal).

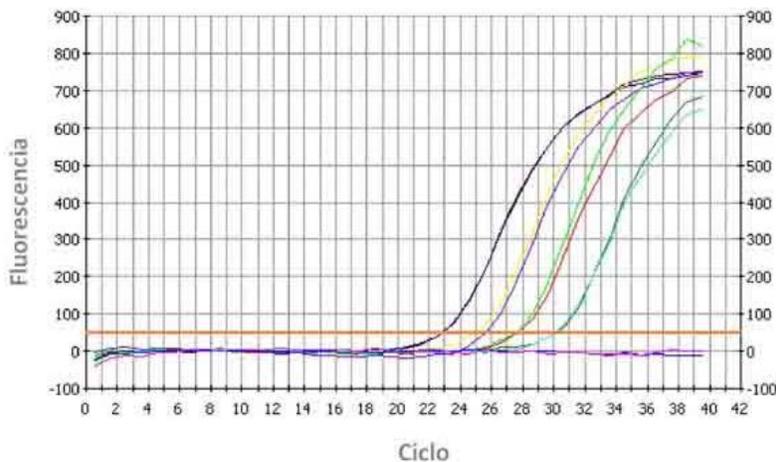


Figura 18. Ct's de una PCR en tiempo real. Gráfica de una PCR en tiempo real donde se representa la cantidad de material genético amplificado mediante unidades relativas de fluorescencia en función del número de ciclos de amplificación. Fuente: <http://www.diagnosticoclinicomoleculard.cl>

3. Justificación

La presencia de *Klebsiella oxytoca* representa un gran peligro para los pacientes hospitalizados con tratamientos prolongados bajo antibióticos. Cuando a un paciente se le administra penicilinas, la microbiota se ve alterada, perdiéndose una importante población de microorganismos que tienen la función de mantener controlados a agentes patógenos, tales como *Clostridium difficile* y *Klebsiella oxytoca* que pueden prevalecer por su resistencia ante estos antibióticos, provocando el desarrollo de enfermedades de carácter crónico-degenerativas como es el caso del síndrome AAHC. La producción de la enterotoxina tilivalina por parte de *Klebsiella oxytoca*, está relacionada con la virulencia de la misma, por lo que surge la necesidad de comprobar si la presencia de diferentes moléculas que actúan como fuentes de carbono, así como la sal en el ecosistema intestinal, tienen efecto en la expresión de los genes encargados de la síntesis de tilivalina y así establecer la importancia de identificar la presencia de *Klebsiella oxytoca* en pacientes hospitalizados a la vez que desarrollar un estratagema para combatir y evitar la síntesis de la tilivalina, precursora del síndrome AAHC.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Analizar la expresión de los genes que codifican para la síntesis de la tilivalina en *Klebsiella oxytoca* mediante la técnica de PCR en tiempo real tras cultivar la bacteria en altas y diferentes fuentes de carbono y de NaCl para evaluar la influencia de los metabolitos del medio en el desarrollo de dicha toxina.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la glucosa y el glicerol en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la tilivalina en *Klebsiella oxytoca*.
- Estudiar el efecto del cloruro de sodio en la transcripción de los componentes que codifican para los componentes enzimáticos de la tilivalina en *Klebsiella oxytoca*.

5. Hipótesis

Si la expresión genética de los genes involucrados en la síntesis de la tilivalina de *Klebsiella oxytoca* es afectada por la presencia de diferentes fuentes de carbono o cambios en la concentración de NaCl que se incorporan en las rutas metabólicas, entonces la presencia de glucosa, glicerol o cloruro de sodio tendrán un efecto diferencial en la expresión de los genes.

6. Materiales y métodos

6.1. Materiales para cultivo bacteriano

Tabla 6. **Materiales.** Materiales, reactivos y cepa utilizadas para la experimentación

Cepa Utilizada
<i>Klebsiella oxytoca</i> 09-7231 (aislada de ratón)
Medios de cultivo utilizado
“Lysogeny Broth” (LB) “Tryptic Soy Broth” (TSB)
Reactivos (soluciones)
Glucosa 20% Glicerol 60% NaCl 5M

6.2. Metodología

6.2.1. Identificación

Se realizó la identificación previa de la cepa de *Klebsiella oxytoca* 09-7231 mediante una tarjeta GN del sistema VITEK-2 para corroborar la identidad y características de la cepa. En la tabla 7 se muestran las pruebas de mayor relevancia realizadas y en Anexos se encuentra la tabla completa con las pruebas realizadas.

Tabla 7. **Pruebas Bioquímicas.** Pruebas bioquímicas realizadas para comprobar la identidad de la cepa *Klebsiella oxytoca* 09-7231

H2S	Fermentación /Glucosa	Ureasa	Citrato	Ornitina Descarboxilasa	Lisina Descarboxilasa	Arginina Arilamidasa
-	+	+	+	-	+	-

En conjunto se realizaron pruebas de sensibilidad con los resultados más relevantes mostrados en la tabla 8 y el resto de las pruebas localizadas en Anexos.

Tabla 8. **Prueba de sensibilidad** Resultados de la prueba de sensibilidad realizada a la cepa *Klebsiella oxytoca* 09-7231.

Antibiótico	CMI	Interpretación
BLEE	NEG	-
Ampicilina	≥ 32	R
Ampicilina/Sulbactam	16	I
Cefalotina	8	S
Fosfomicina	64	R
Nitrofurantoína	≤ 16	S
Trimetoprima/Sulfametoxazol	≤ 20	S

6.2.2. Crecimiento bacteriano

En un tubo de 15 mL se agregaron 5 mL de medio LB y 5 µL de ampicilina en este medio, se sembró la cepa de *Klebsiella oxytoca*, la cual se encontraba preservada por congelación.

El cultivo se incubó a 37°C por 24hrs. Al siguiente día, se hizo un subcultivo en las siguientes condiciones: LB no suplementado (control), LB + 0.5 % glucosa, LB + 0.5 % glicerol y LB + 0.3 M NaCl. La preparación de los medios de cultivo se hizo de acuerdo con las soluciones concentradas existentes en el laboratorio.

Tabla 9. Concentración de reactivos. Concentración de los reactivos disponibles en el laboratorio y concentraciones deseadas para la experimentación.

Reactivos	Concentraciones deseadas
Glucosa 20 %	0.5 %
Glicerol 60 %	0.5 %
NaCl 5 M	0.3 M

Cálculos para la preparación de reactivos suplementario.

$$\text{Glucosa: } \frac{0.5\% \times 5\text{mL}}{20\%} = 125 \mu\text{L}$$

$$\text{Glicerol: } \frac{0.5\% \times 5\text{mL}}{60\%} = 41.6 \mu\text{L}$$

$$\text{NaCl: } \frac{0.3\text{M} \times 5\text{mL}}{5\text{M}} = 300 \mu\text{L}$$

De acuerdo a los cálculos obtenidos se prepararon los tubos con las condiciones óptimas para su crecimiento como se indica en la tabla 10 y posteriormente se incubaron los 4 tubos a 37 °C por 5 horas (Fase logarítmica).

Tabla 10. Subcultivos: Condiciones de crecimiento bacteriano. Cantidad de medio, "ON" y reactivo que requiere cada una de las condiciones.

Condiciones	Medio TSB	"ON"	Reactivo
Control	5 mL	50 µL	-
Glucosa	5 mL	50 µL	125 µL
Glicerol	5 mL	50 µL	42 µL
NaCl	5 mL	50 µL	300 µL

6.2.3. Extracción de DNA genómico

Se realizó la extracción de DNA genómico mediante el método de choque térmico descrito por González y Merchand *et al.* (1996) a la pastilla de cultivo "ON" de la cepa de *Klebsiella oxytoca* a partir de un cultivo de 10 mL en medio LB. Para obtener la pastilla el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, pasado el tiempo de centrifugación se desechó el sobrenadante. A la pastilla se le adicionaron 500 µL de regulador de lisis (cloruro de guanidinio 6 M, Tween 80 al 10%, EDTA 0.5 M y 2-β-mercaptoetanol 14.7 M) y se resuspendió con la punta de la micropipeta y en Vórtex durante 30 s, posteriormente se colocó la suspensión en un tubo Eppendorf de 2 mL y se agitó en Vórtex durante 30 s. A continuación, a la suspensión se le realizó la lisis por choque térmico que consistió en colocar el tubo a -70 °C durante 10 min, posteriormente el tubo se calentó por 10 min a 65 °C en un "ThermoMixer F2.0". El procedimiento de choque térmico se repitió por duplicado. Al lisado obtenido se le adicionaron 500 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25: 24: 1 (fase inferior), se agitó en Vórtex durante 30 s y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 30 °C. Pasado el tiempo de centrifugación se extrajo la fase acuosa (aprox. 500 µL) y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL al cual se le adicionaron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24: 1, se agitó en Vórtex por 30 s y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 30 °C. Posteriormente, la fase acuosa (aprox. 500 µL) se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL y se añadió 1 mL de etanol absoluto frío, se agitó brevemente en Vórtex y se incubó a -20 °C durante toda la noche para precipitar el DNA. Para obtener la pastilla del DNA precipitado se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Posteriormente se decantó el etanol absoluto y se adicionó 500 µL de etanol al 70% frío para lavar la pastilla; se agitó ligeramente en Vórtex, se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y se decantó el etanol al 70%. A continuación, la pastilla se secó en un "Speedvac" (Eppendorf) durante 15 min a 30 °C, se resuspendió en 50 µL de agua PureLab estéril y se cuantificó en NanoDrop para determinar concentración y pureza entre 1.8 y 2.2. Por último, El DNA extraído se visualizó por corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% para verificar la integridad.

6.2.4. Amplificación de los genes *rrsH*, *mfsX*, *npsA* y *aroX* mediante PCR de punto final.

Con el fin de confirmar que los oligonucleótidos amplificarán el producto del tamaño esperado en pb, se realizó una PCR punto final empleando la siguiente mezcla de reacción: 1U de Taq polimerasa (0.25 µL) (Phusion), 2.5 µL de buffer 10X, 1.5 µL de MgCl₂ a una concentración de 25 mM (Invitrogen), 0.5 µL de dNTPs a una concentración de 10 mM (Invitrogen), 0.5 µL de cada uno de los oligonucleótidos a una concentración de 20 µM, 0.5 µL de DNA genómico a una concentración de 100 ng/mL y se llevó a un volumen final de 25 µL adicionando 18.5 µL de agua estéril libre de

nucleasas. Los tubos de 0.2 mL con la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador (Mastercycler® Eppendorf); Los ciclos de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min; posteriormente 30 ciclos con las siguientes condiciones: un segundo ciclo de desnaturalización a 95 °C por 1 min, una fase de alineamiento de 58 °C para los genes de estudio por 45 s y una fase de elongación a 72 °C por 1 min; finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min. Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante un corrimiento electroforético a 85 V por 45 min en un gel de agarosa al 1% preteñido con bromuro de etidio (10 mg/mL), colocando en cada pozo 5 µL de producto de PCR y usando como regulador TAE 1X.

6.2.5. Estandarización del método RT-qPCR de los genes *rrsH*, *mfsX*, *npsA* y *aroX* de *Klebsiella oxytoca* a partir de curvas estándar

Las curvas estándar se realizaron utilizando un stock de DNA de *K. oxytoca* previamente extraído con una concentración de 2000 ng/mL, a partir de este se realizó una dilución 1:40. Posteriormente se tomaron 20 µL de la dilución 1:40 y se colocaron en 80 µL de agua PureLab para obtener una dilución 1:5, dicha dilución se realizó por triplicado con el fin de obtener las concentraciones de 10 ng/mL, 2 ng/mL, 0.4 ng/mL y 0.08 ng/mL de las cuales se tomó un volumen de 2.5 µL para obtener una concentración final de 25 ng, 5 ng, 1 ng y 0.5 ng por mL de DNA respectivamente en un volumen final de 10 µL. Con las diluciones del DNA con las concentraciones anteriormente mencionadas se realizaron las reacciones de qPCR en tiempo real empleando el kit comercial “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” de Roche. En la mezcla de reacción se utilizaron 2.5 µL de DNA, 5 µL de SYBR® Green (Fast Star Taq DNA polimerasa (5 U/µL), dNTP’s 10 mM, MgCl₂ 25 mM y SYBR Green I 5 µM), 0.5 µL de cada oligonucleótido (20 µM) y 1.5 µL de agua. Las reacciones para los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de plástico de 96 pozos especiales para el equipo Lightcycler®480. Cada reacción se realizó por quintuplicado para cada una de las concentraciones de DNA. Posteriormente la placa se colocó en el equipo LightCycler® 480 (Roche) aplicando el programa recomendado por el manual del usuario, el cual se describe a continuación: un ciclo a 95 °C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 s, temperatura de alineamiento correspondiente para cada par de iniciadores durante 10 s y 72 °C durante 12 s (en este punto se hizo la medición de fluorescencia), posteriormente un ciclo en las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 s a una velocidad de 4.4 °C/s, 65 °C durante 1 min a una velocidad de 2.2 °C/s y 97 °C durante 5 s (durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva

de disociación), y un ciclo final de enfriamiento a 40 °C durante 10 s. Una vez estandarizadas las curvas se realizó la extracción del RNA total de las cepas de estudio.

6.2.6. Extracción de RNA total

Las bacterias se centrifugaron a 4600 rpm por 10 minutos para obtener una pastilla. A partir de este punto, los procedimientos se realizaron usando hielo para evitar la degradación del material genético por efecto de la temperatura. El sobrenadante se desechó de un solo movimiento evitando la pérdida de la pastilla.

El fenol-ácido se pre-calentó a 65°C en tubos de 2 mL usando el equipo Thermoblock (Eppendorf) y se preparó una solución de lisis con las concentraciones y cantidades indicadas en la tabla 11:

Tabla 11. Solución de lisis. Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de la solución de lisis.

Reactivos	1X	5X
Agua destilada	910 µL	4,550 µL
SDS 10 %	50 µL	250 µL
Acetato de sodio 1 M	20 µL	100 µL
EDTA 0.5 M	20 µL	100 µL
Volumen final	1 mL	5 mL

Se agregaron 500 µL de la solución de lisis a cada pastilla bacteriana y posteriormente se sometieron a agitación en vortex 30 segundos y descanso en hielo de 30 segundos de forma seguida durante 3 minutos. El contenido de los tubos se transfirió a los tubos con fenol-ácido y se incubaron 5 minutos a 65°C con agitación (1500 rpm). Los tubos fueron sometidos nuevamente a agitación en vortex 30 segundos (Durante todo el proceso de manipulación, los tubos se mantuvieron en hielo). Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se obtuvo la fase acuosa (aproximadamente 400 µL) y fue transferida a tubos nuevos de 1.5 mL. Posteriormente, se adicionó 1 mL de etanol absoluto frío para posteriormente llevarse a agitación ligera en vortex tipo Fisher e incubar a -70 °C por 24 h para favorecer la precipitación del RNA. Al siguiente día, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C eliminando el sobrenadante. Se añadió 1 mL de etanol al 70 % frío y se agitó en vortex tipo Fisher para homogenizar. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 12000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 400 µL de solución de lisis y se mezcló en vortex tipo Fisher por 30 segundos. Se repitió el procedimiento a partir de la adición del etanol absoluto exceptuando la incubación a -70 °C por 24 h y hasta antes de adicionar

los 400 μL de la solución de lisis. La pastilla se secó alrededor de 15 minutos en el equipo Speedvac, y finalmente se resuspendió en 50 μL de agua DEPC, guardándose a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para eliminar el DNA residual en las muestras, el RNA fue tratado con DNasa del kit comercial DNasa Turbo de Ambion®, de acuerdo a la tabla 12.

Tabla 12. Tratamiento del DNA residual. Reactivos utilizados para eliminar restos de DNA en las muestras.

Reactivos	
1 μL Ribolock	
5 μL Buffer (10% del volumen)	
1 μL enzima DNasa	

Las muestras se incubaron 30 min con agitación cada 10 minutos. A continuación, se agregaron 5 μL de la solución de inactivación. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos y separó la fase acuosa, la cual se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL. La integridad del RNA se analizó por medio de una electroforesis usando un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes. El gel se preparó de acuerdo a lo siguiente: se pesaron 0.6 g de agarosa y se disolvió en 30 mL de TAE con 300 μL de Clorox® en un matraz de 250 mL; la solución se calentó usando pulsos de 25 segundos hasta obtener la solución totalmente transparente. El gel se resolvió por 50 min a 100 V y posteriormente fue teñido con bromuro de etidio. La cuantificación del RNA se llevó a cabo en el equipo NanoDrop.

6.2.7. Síntesis del cDNA

La retrotranscripción (RT) se realizó empleando el kit comercial “First Strand cDNA Synthesis” de Thermo Scientific®. Se trabajó a partir de una concentración de 1000 ng de RNA, para lo cual cada muestra se preparó de acuerdo a la tabla 13.

Tabla 13. Mezcla de reacción para transcripción. Reactivos para la mezcla de reacción.

MM cDNA kit	1x
Random primer	1 μL
Buffer	4 μL
Ribolock (Inhibidor)	1 μL
dNTP's	2 μL
Retrotranscriptasa	1 μL
Volumen final	9 μL

Con base en 1000 ng de concentración para la preparación de cDNA se tomaron las siguientes cantidades de RNA de las muestras analizadas:

$$\text{Control: } \frac{1000 \text{ ng}}{1830.5 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 0.6 \mu\text{L}$$

$$\text{Glucosa: } \frac{1000 \text{ ng}}{1985.7 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 0.5 \mu\text{L}$$

$$\text{Glicerol: } \frac{1000 \text{ ng}}{1317.4 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 0.8 \mu\text{L}$$

$$\text{NaCl: } \frac{1000 \text{ ng}}{163.6 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 6.1 \mu\text{L}$$

Las cantidades para llevar a cabo la reacción síntesis del cDNA fueron las siguientes.

Tabla 14. Condiciones para la síntesis del cDNA en cada condición. Cantidad y reactivo para la síntesis del cDNA.

Condición	MM (mezcla)	Agua	RNA
Control	9 μL	10.4 μL	0.6 μL
Glucosa	9 μL	10.5 μL	0.5 μL
Glicerol	9 μL	10.2 μL	0.8 μL
NaCl	9 μL	4.9 μL	6.1 μL

La mezcla final de reacción se mezcló y se incubó a 25 °C por 5 min. Posteriormente, se incubó a 42 °C durante 60 min. La enzima retrotranscriptasa se inactivó calentando a 70°C durante 5 min. La mezcla se colocó en hielo y finalmente se almacenó a -70°C hasta su uso. El cDNA se diluyó 1:50 con agua DEPC llegando a un volumen final de 750 μL con 15 μL de cDNA y 735 μL de agua DEPC.

6.2.8. qPCR

La mezcla para llevar a cabo la reacción de PCR en tiempo real se utilizó una micro placa con 96 pozos en la cual se colocaron los cDNA's preparados y los oligonucleótidos correspondientes, así como el SYBR Master Mix, de acuerdo a la tabla 15.

Tabla 15. Mezcla de reactivos para la PCR en tiempo real. Cantidad y reactivos utilizados para la mezcla de qPCR.

Reactivo	1X
Agua	1.5 μL
Oligonucleótido 5' (20 μM)	0.5 μL
Oligonucleótido 3' (20 μM)	0.5 μL
Master Mix SybrGreen	5.0 μL
cDNA	2.5 μL
Volumen final	10 μL

Los genes a evaluar fueron *mfsX*, *aroX* y *npsA* utilizando *rrsH* como control constituyente con los siguientes oligonucleótidos.

- *rrsH*

“Forward” primer 5’ CAGCCACACTGGAAGTGA
“Reverse” primer 5’ GTTAGCCGGTGCTTCTCTG
- *mfsX*

“Forward” primer 5’ TTTACTTAGCGCCGTTGCTG
“Reverse” primer 5’ AAAGCGGTGATGCTAAGCTG
- *aroX*

“Forward primer” 5’ TGTTGCCTGCAAGATTGACG
“Reverse primer” 5’ ATGTGTGAACGGCCAAAACG
- *npsA*

“Forward primer” 5’ AAATACGTGGCTCCGCATC
“Reverse primer” 5’ TCCTGCGTGACATAACAAGC

Las condiciones utilizadas para la PCR en tiempo real a partir de las curvas tipo fueron las siguientes:

Tabla 16. Condiciones para la PCR en tiempo real. Condiciones empleadas para llevar a cabo la PCR en tiempo real.

	Temperatura	Tiempo
Inicial	95 °C	5 min
Número de ciclos	1	
Desnaturalización	95 °C	10 s
Alineación	59 °C	10 s
Extensión	72 °C	10 s
Número de ciclos	45	
Final	95 °C	5 s
	65 °C	1 min
	97 °C	5 s
Número de ciclos	1	
Enfriamiento	40 °C	10 s
Número de ciclos	1	

7. Resultados y observaciones

7.1. Extracción del DNA genómico

Una vez extraído el DNA genómico de *Klebsiella oxytoca* 09-7231, se procedió a medir en el Nano Drop-1000 la concentración y pureza del mismo, obteniéndose una concentración de 232 ng/ μ L y una pureza de 2.07 según el cociente de absorción A260/280 nm. Posteriormente se demostró que dicho DNA presentaba una calidad adecuada de acuerdo con el tamaño de la banda (Figura 19).

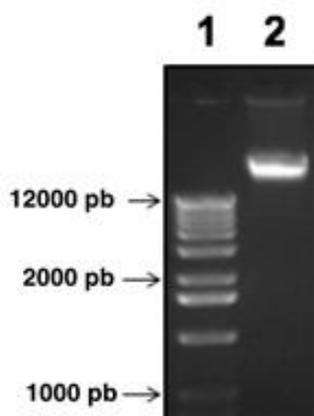


Figura 19. Electroforesis del DNA genómico de *Klebsiella oxytoca* 09-7231. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb plus Invitrogen®; Carril 2, DNA genómico de *Klebsiella oxytoca* 09-7231 en fase estacionaria de crecimiento.

7.2. Construcción de curvas tipo

Las condiciones de reacción se estandarizaron para cada amplicón, obteniéndose una temperatura de alineamiento entre 59°C y 60°C dependiendo del gen y un número de ciclos totales de 35 para todos ellos.

Tabla 17. Temperatura de alineamiento (T_m). Temperatura de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes involucrados en la síntesis de la tilivalina por qPCR.

Gen	T _m (°C)
<i>mfsX</i>	59
<i>npsA</i>	59
<i>aroX</i>	59
<i>rrsH</i>	59

Se construyeron las curvas tipo graficando en el eje de las ordenadas la intensidad de fluorescencia y en el eje de las abscisas el ciclo de PCR (Figura 20). En esta figura se muestra que, a mayor concentración de DNA, la fluorescencia debida a la amplificación se detectó con un menor número de ciclos de la PCR. Por ejemplo, para todos los genes evaluados, la fluorescencia comenzó a detectarse antes del ciclo 15 cuando la muestra contaba con 50 ng/ μ L de DNA; mientras que para 5 ng/ μ L, la fluorescencia se detectó justo después del ciclo 16 y para 0.5 ng/ μ L y 0.05 ng/ μ L hasta el ciclo 20 y 22, respectivamente.

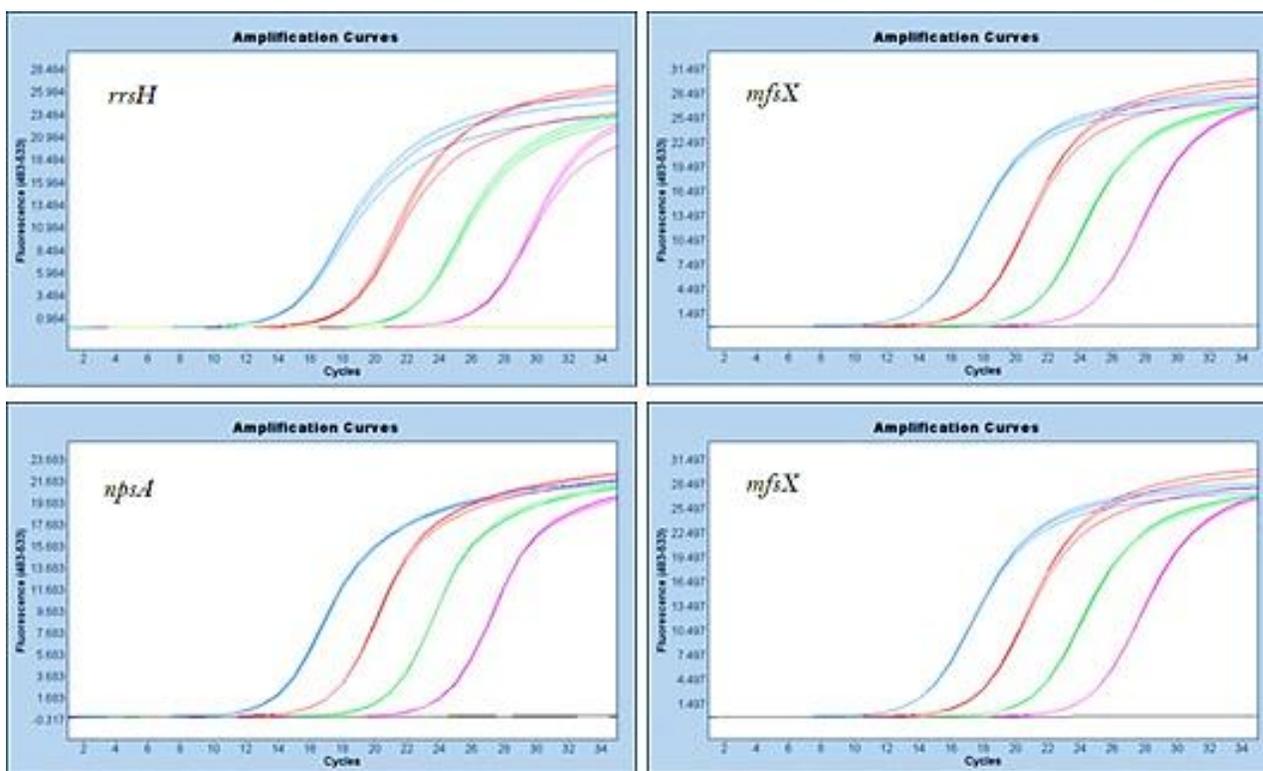


Figura 20. Curvas de amplificación de los genes *rrsH*, *mfsX*, *npsA* y *aroX*. En el eje de las ordenadas se gráfica la fluorescencia y en el eje de las abscisas el ciclo de PCR. Todas las curvas se realizaron por triplicado. Cada gráfica presenta cinco curvas de izquierda a derecha correspondiente a la concentración 50, 5, 0.5 y 0.05 ng/ μ l de DNA.

A partir de las curvas de amplificación se generaron las curvas tipo, para cada gen, con la finalidad de poder interpolar puntos experimentales en dichas curvas (Figura 21). En cada una de las curvas se determinó la eficiencia de reacción, así como el coeficiente de correlación, encontrando en todos los casos una eficiencia de reacción cercana a 2.0 y un coeficiente de correlación cercano a la unidad.

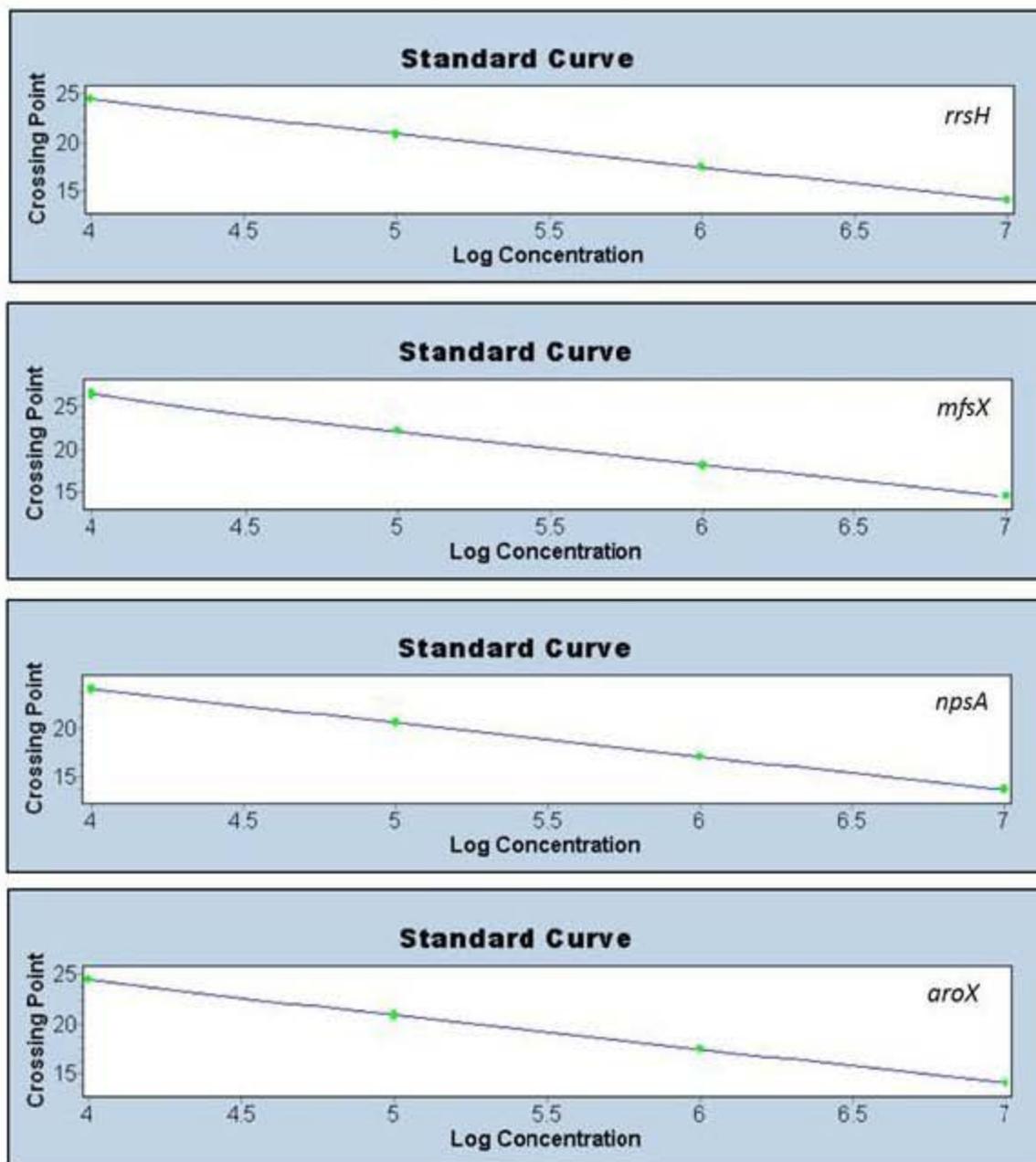


Figura 21. Linealización de las curvas de amplificación (curvas tipo) de los genes *rrsH*, *mfsX*, *npsA* y *aroX*. En el eje de las ordenadas se presenta el punto de cruce de acuerdo al número de ciclos de la PCR y en el eje de las abscisas se muestra la concentración del producto expresada en la concentración del DNA.

Así mismo, mediante análisis del producto de PCR por curva de desnaturalización se observó solo un pico o producto de desnaturalización, lo que indicó la ausencia de amplificación de productos inespecíficos en la reacción, es decir sólo se generó el amplicón correspondiente para el cual los oligonucleótidos fueron diseñados (Figura 22).

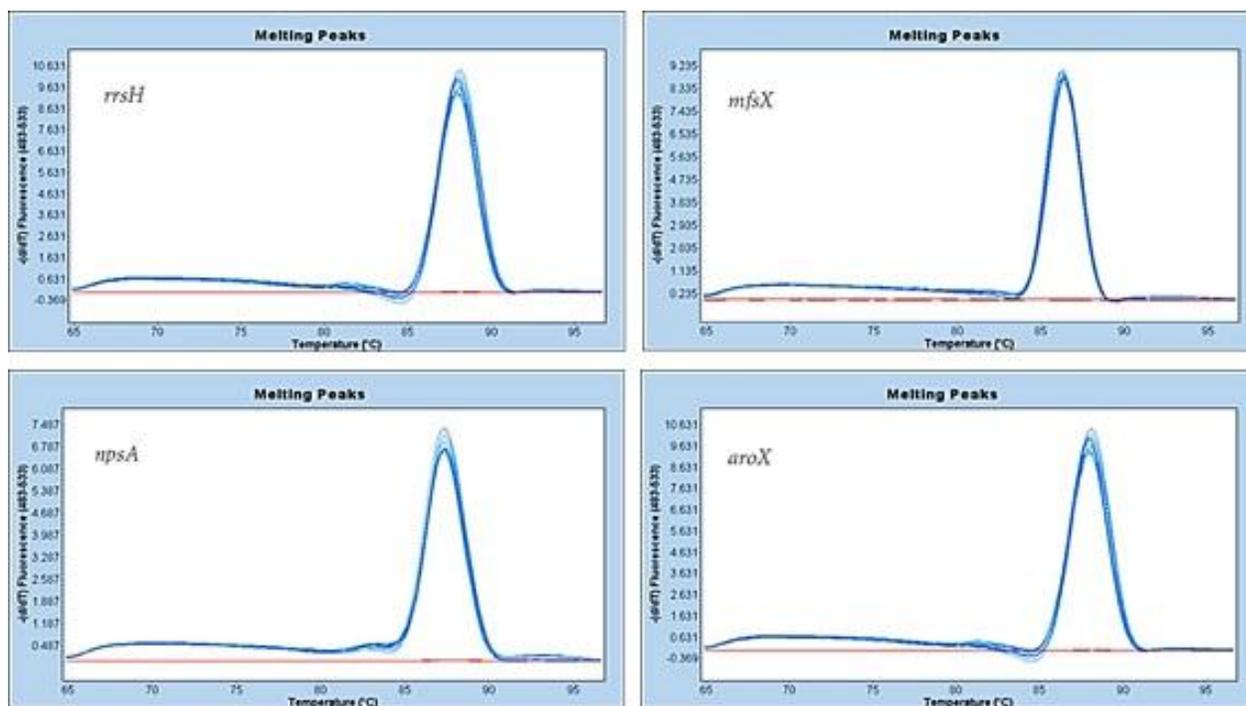


Figura 22. Curvas de desnaturalización de los productos de amplificación de los genes *rrsH*, *mfsX*, *npsA* y *aroX*. En el eje de las ordenadas se presenta la derivada negativa de la fluorescencia y en el eje de las abscisas la temperatura en °C.

7.3. Extracción de RNA total bacteriano

Se obtuvieron concentraciones de RNA entre 1317.4 ng/ μ L y 1985.7 ng/ μ L y una pureza entre 1.9 y 2.0 según el cociente de absorción A260/280 nm (Tabla 18). Posteriormente se realizó un gel de agarosa para comprobar la integridad de los RNAs extraídos, observándose un patrón de migración de tres bandas, el cual es característico del rRNA 23S, debido a la presencia de dos secuencias de intervención (IV), que lo fragmentan (Figura 23).

Tabla 18. Concentración y pureza de los RNA extraídos en *Klebsiella oxytoca* en las diferentes condiciones empleadas.

Medio LB	Control [ng/ μ L]	Glucosa [ng/ μ L]	Glicerol [ng/ μ L]	NaCl [ng/ μ L]
Concentración de RNA	1830.5	1985.7	1317.4	1636.0
A260/280	2.0	2.0	2.0	1.9

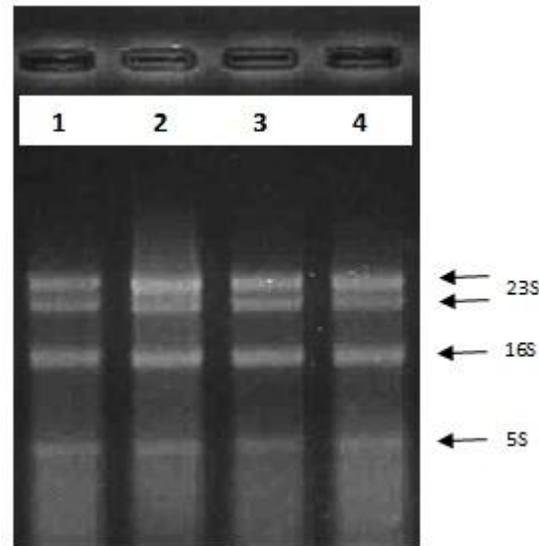


Figura 23. Electroforesis del RNA total de *Klebsiella oxytoca* en las diferentes condiciones de crecimiento. Se muestra la integridad del RNA extraído (rRNA 23, 16 y 5S) del crecimiento de *Klebsiella oxytoca* en TSB no suplementado (1), TSB + glucosa 0.5% (2), TSB + glicerol 0.5% (3) y TSB + NaCl 0.5 M (4). En *Klebsiella oxytoca* se observa un patrón de migración diferente del 23S, debido a que dentro del gen *rrl*, para el 23S, posee 2 “intervining sequences” (IVs) que lo fragmentan sin perder su función.

7.4. Expresión genética de los genes evaluados en presencia de glucosa, glicerol y sal

Se determinó la expresión relativa de tres genes que codifican para componentes que forman parte de la síntesis de la tilivalina (*mfsX*, *npsA*, y *aroX*) en la cepa silvestre crecida en medio TSB no suplementado, TSB + glucosa 0.5 %, TSB + glicerol 0.5 % y TSB + NaCl 0.5 M. La transcripción se expresó como el número de veces que incrementó o disminuyó la expresión de los genes de la cepa silvestre de *Klebsiella oxytoca* en los diferentes medios suplementados con respecto al medio no suplementado. En términos de la presencia de glucosa en el medio de cultivo, la expresión de los genes *npsA* y *aroX* incrementó alrededor de dos veces, mientras que la expresión del gen *mfsX* disminuyó a la mitad. El glicerol tuvo un efecto más dramático en la expresión de los genes relacionados con la síntesis de la tilivalina, ya que los tres genes evaluados se incrementaron en presencia de esta fuente de carbono, principalmente el gen *npsA* que aumentó 5 veces con respecto al medio no suplementado. El efecto de alta osmolaridad producido por la adición de sal (NaCl) tuvo un efecto negativo en los tres genes analizados, principalmente en el gen *aroX*, el cual se reprimió casi 10 veces con respecto al medio no suplementado.

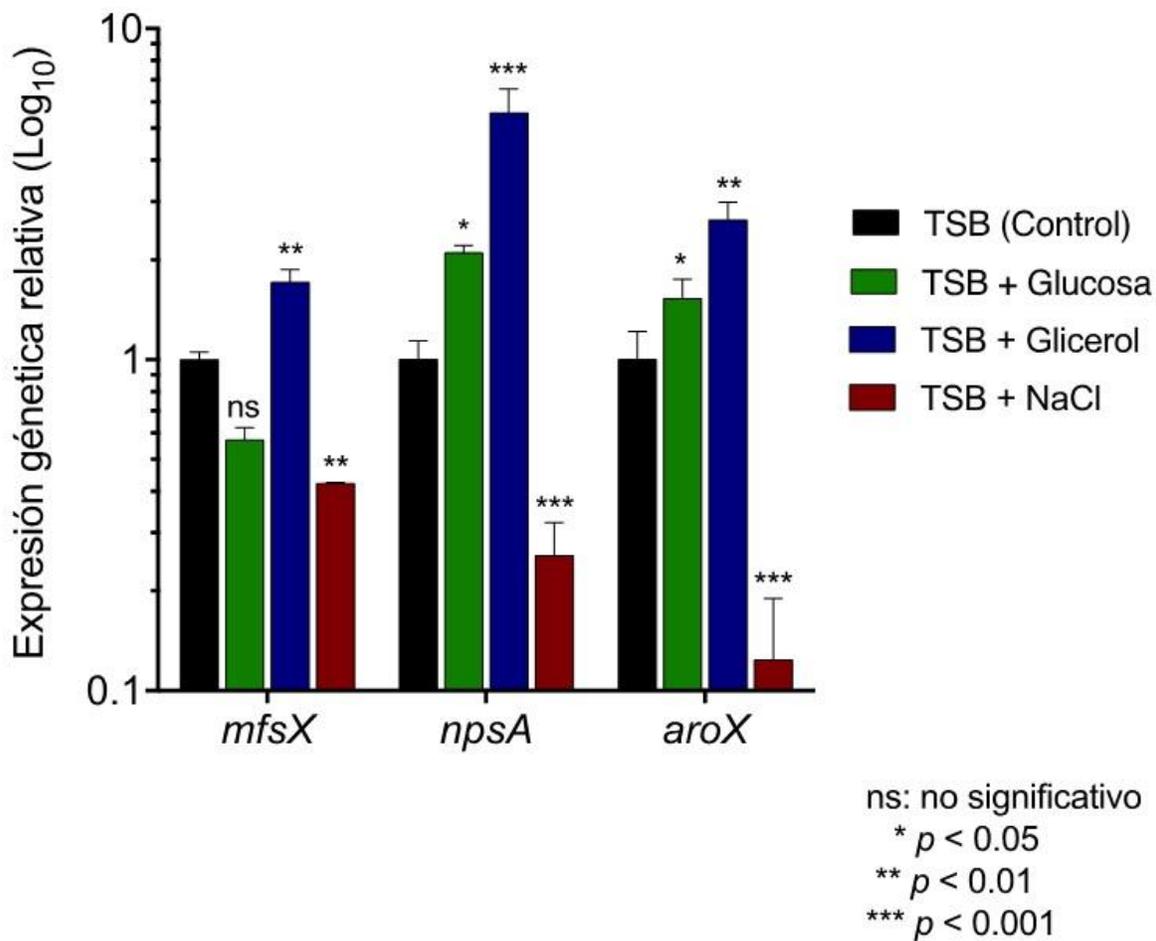


Figura 24. Expresión relativa de los genes relacionados a la síntesis de la tilivalina en presencia de glucosa, glicerol y sal. Análisis de la expresión genética de genes *mfsX*, *npsA* y *aroX* codificados dentro de la isla de patogenicidad asociada a la tilivalina. *Klebsiella oxytoca* se creció en medio TSB no suplementado y en presencia de glucosa (0.5 %), glicerol (0.5 %) y cloruro de sodio (0.3 M). Se muestran los valores de transcripción que se obtienen al dividir los niveles de expresión de cada condición entre el medio TSB no suplementado (control). Diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa silvestre: * $p < 0.05$; * $p < 0.01$; * $p < 0.001$.

8. Discusión

En el pasado, la colitis hemorrágica asociada al uso de antibióticos se relacionaba con la producción de toxinas en el colon por parte de *Clostridium difficile*. En los últimos años se ha encontrado una mayor prevalencia de *Klebsiella oxytoca* en casos de colitis hemorrágica asociado al uso de penicilinas (Darby *et al.*, 2014). En estudios recientes se describió que *Klebsiella oxytoca* posee la capacidad de sintetizar una toxina con efecto citotóxico llamada tilivalina, cuyo mecanismo de acción la lleva a unirse con la tubulina durante el ciclo de replicación celular y estabilizar los microtúbulos para arrestar la mitosis (Unterhauser *et al.*, 2019).

El presente trabajo tuvo como objetivo comprobar y analizar el efecto de las fuentes de carbono (glucosa y glicerol) y la sal como señales activadoras o represoras en la expresión de los genes que codifican para la síntesis de tilivalina en *Klebsiella oxytoca*.

La glucosa posee un papel de suma importancia en la regulación de la transcripción genética, ya que participa como principal fuente de carbono para los organismos. Los niveles de glucosa en el medio exterior tienen efecto en la expresión de genes, principalmente en los que codifican enzimas para otros carbohidratos diferentes de la glucosa como son lactosa o sacarosa (Casado, 2015).

La presencia de glucosa en medio donde crecen algunos organismos como *Escherichia coli* tiene un efecto inhibitorio sobre la enzima adenilato ciclasa, productora de AMP cíclico (cAMP). En ausencia de glucosa, los niveles de cAMP se elevan, permitiendo la unión a la proteína reguladora CRP, formando el complejo CRP-cAMP. La fijación del complejo a una secuencia corta cercana al promotor facilita la unión e iniciación de la RNA polimerasa. Dicho complejo es capaz de reconocer secuencias y permitir su transcripción, como es el caso del operón *lac* (Pereté *et al.*, 2007).

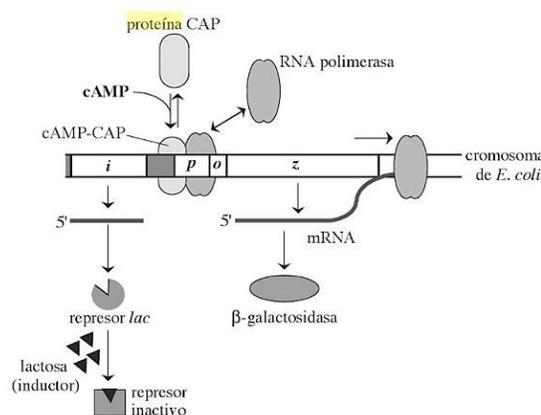


Figura 25. Mecanismo de acción de la proteína CRP o CAP sobre el operón *lac*. El complejo CAP-cAMP se une a secuencias específicas cercanas al promotor, permitiendo la unión y activación de la RNA polimerasa. Obtenido de Pereté *et al.*, 2007.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la glucosa tiene un efecto de regulación positiva sobre la expresión de los genes *npsA* y *aroX*, sin embargo, el gen *mfsX* presentó una disminución de la expresión con respecto al control (Figura 19).

La propuesta del mecanismo de acción que ejerce la glucosa sobre los genes relacionados con la síntesis de la tilivalina, es que la proteína CRP posee un efecto represor sobre la expresión de los genes *npsA* y *aroX* con lo cual, el incremento de la concentración de la glucosa modula la actividad de la adenilato ciclasa, impidiendo o suprimiendo la producción de cAMP, el cual es un cofactor de la proteína reguladora CRP, y al tener bajos niveles de CRP, los genes *npsA* y *aroX* incrementan su expresión. Este mecanismo de regulación se ha descrito en la expresión de los genes que codifican para la toxina termolábil de tipo I (LT-I) en *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), donde la proteína CRP tiene afinidad por un sitio específico dentro del operador de este gen, que impide la formación de un complejo abierto de RNA polimerasa suprimiendo su expresión (Bordero y Munson, 2009).

Como ejemplo están los genes *IngR*, *IngS* y *IngA* en ETEC, los cuales participan en la expresión de un pili tipo 4 de larga longitud llamado Longus. Estos genes presentan una regulación negativa por parte de CRP donde al crecer la bacteria en un medio rico en glucosa, la actividad de CRP baja como consecuencia de la disminución en los niveles de cAMP y se mostró que la expresión de los genes mencionados, se incrementaba frente a la glucosa (De la Cruz *et al.*, 2017).

En el caso de *mfsX*, donde la glucosa actúa como un inhibidor de su expresión transcripcional, se podría sugerir a CRP como un regulador positivo, ya que al disminuir los niveles de cAMP mediada por los altos niveles de glucosa, CRP no podría unirse al operador de este gen, disminuyendo la actividad de la CPR como regulador positivo y suprimiendo la expresión de *mfsX*. Haycocks demostró el efecto de la glucosa como inhibidor sobre algunos genes y activador sobre otros en el mismo agente patógeno como lo hizo con la toxina termolábil en ETEC, donde encontró que CRP activa la transcripción en el promotor *estA2* e inhibe al promotor *eltAB* por competencia con H-NS, proteína tipo histona (Haycocks *et al.*, 2015).

Por otro lado, el glicerol forma parte de los triacilgliceridos y en los fosfolípidos, siendo estos los principales formadores de los bloques de construcción en membranas tanto procariontas como eucariotas. Por lo tanto, es un compuesto de gran abundancia en cualquier organismo vivo. Su importancia también recae al ser un vínculo importante entre azúcares y ácidos grasos. Al reducir el fosfato de dihidroxiacetona (DHAP, triosa clave del metabolismo de la glucosa) en glicerol-3-fosfato, se puede eliminar de la vía de glucólisis y usar para la síntesis de lípidos. De igual forma los lípidos se pueden degradar a ácidos grasos y dejando que el glicerol ingrese en la vía de glucólisis como DHAP (Doi, 2019).

En algunos genes, la glucosa y el glicerol tienen efecto antagónico sobre la actividad de la proteína CRP, mientras una fuente de carbono lo activa la otra lo reprime, y viceversa, teniendo como ejemplo la expresión de *IngR*, *IngS* y *IngA* donde las altas concentraciones de glucosa dieron lugar al aumento de la expresión en dichos genes; en contraste, el medio rico en glicerol provocó un efecto represor sobre estos genes. En este modelo, el glicerol podría estar efectuando un incremento en los niveles de cAMP o activación de la proteína CRP que conlleva a un incremento en la expresión de genes para incrementar la acción metabólica sobre glicerol y en conjunto, la expresión de los genes evaluados (De la Cruz *et al.*, 2017).

La proteína CRP ha sido blanco de múltiples estudios sobre su acción reguladora en bacterias, donde se han propuesto 245 secuencias de unión o promotores diana en el genoma de *Escherichia coli*, a lo que se suma la transcripción de genes involucrados en el metabolismo del glicerol como es el gen facilitador de glicerol *glpF*, y donde las altas concentraciones de glicerol en el medio incrementan la presencia de cAMP, determinamos que la presencia de glicerol es un factor relevante para la producción de cAMP y la formación del complejo con CRP, teniendo como blanco genes involucrados en el metabolismo del glicerol y síntesis de la tilivalina como los genes *npsA*, *mfsX* y *aroX* (Figura 19; Hartl, 2009; Shimada *et al.*, 2011).

En contraste con el efecto ejercido del glicerol, las altas concentraciones de sal produjeron un significativo efecto represor en la expresión de los tres genes evaluado (Figura 19). Se ha visto que los cationes divalentes y el NaCl tienen efecto sobre la conformación de la proteína H-NS, la cual es un regulador global de la transcripción al impedir la unión de la RNA polimerasa a los sitios blanco de unión. Sin embargo, H-NS tiene como principal función silenciar genes de virulencia y en presencia de sales, el cambio de conformación permite la inhibición de dicha proteína, obteniendo como resultado la transcripción de ciertos genes silenciados como fue reportado con el gen que codifica la toxina termolábil (LT) de ETEC, donde H-NS silencia a los promotores *eltA*, *eltB*, *estA1* y *estA2* de forma directa y por oclusión de CRP a *estA2* nuevamente (Bodero y Munson, 2009; Haycocks *et al.*, 2015). Al someter al patógeno a concentraciones elevadas de sal, se obtuvo un incremento de la expresión en los genes silenciados. En el caso de *Klebsiella oxytoca*, presenta un caso totalmente contrario, donde los genes son suprimidos por acción reguladora de la proteína H-NS en altas concentraciones de NaCl o por efecto de algún otro regulador transcripcional (Dorman, 2007; Haycocks *et al.*, 2015).

Éstos resultados abren el camino a perspectivas futuras al saber que las fuentes de carbono en especial el glicerol en altas concentraciones eleva la expresión de algunos genes que participan en la síntesis de tilivalina se debe tener precaución y estudiar las condiciones del paciente, debido a que el glicerol es un precursor para la síntesis de triglicéridos y de fosfolípidos en el hígado y tejido adiposo, su presencia puede ser abundante, ya que cuando el cuerpo utiliza la grasa almacenada para la energía, glicerol y ácidos grasos se liberan en el torrente sanguíneo y entonces el glicerol puede ser convertido en glucosa en el hígado para el suministro de energía en el metabolismo celular. También se ha visto el uso de glicerol como agente en contra de estreñimiento, pues sus propiedades higroscópicas y lubricantes lo hacen un compuesto laxante.

Los efectos del NaCl tienen gran importancia en el tratamiento o para evitar el desarrollo de AAHC, dado que actúa como inhibidor de la expresión de los genes, puede frenar la síntesis de la toxina y permitir la recuperación en los pacientes.

No obstante, dichos resultados también pueden ser utilizados para proyectos de investigación que complementen el estudio de la tilivalina para corroborar qué mecanismo de regulación efectúa fuentes de carbono sobre los reguladores genéticos como son CRP, cAMP y la proteína H-NS que posee *Klebsiella oxytoca*, además de experimentar con los genes restantes que intervienen en la síntesis de la tilivalina.

9. Conclusiones

- El uso de reactivos para la extracción de material genético en lugar del uso de kit comercial, permite economizar la experimentación además de haber demostrado excelente resultado en la obtención de material genético bacteriano.
- La incorporación de PCR para analizar la expresión de los genes proporcionó mayor especificidad a la experimentación y un mejor control sobre las variables que pueden surgir.
- Se encontró que el glicerol es un potente activador de la expresión en los genes evaluados que participan en la síntesis de la tilivalina (*mfsX*, *npsA* y *aroX*), seguido de la glucosa con un incremento significativo sobre la expresión de los genes *npsA* y *aroX* y con un efecto antagonista sobre *mfsX*.
- El cloruro de sodio posee un fuerte efecto inhibitor sobre la expresión de los genes evaluados.
- El análisis de la expresión demostró ser afectado en gran medida por los metabolitos y fuentes de carbono presentes en el medio, esto revela la importancia de estudiar las condiciones en las cuales pueda presentarse *Klebsiella oxytoca* en pacientes admitidos en hospitales, ya que corren el riesgo para desarrollar AAHC.

10. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo abren las puertas a la creación de nuevas medidas para la prevención del desarrollo de AAHC en pacientes hospitalizados, así como en el tratamiento de dicho síndrome gracias al conocimiento del efecto que provoca las altas concentraciones de NaCl sobre los genes que codifican para la síntesis de la toxina tilivalina.

También se abre el camino a otros trabajos experimentales para evaluar los genes restantes y otras fuentes de carbono puesto que conocer el efecto que proporciona las sustancias que suelen estar presentes en el tracto intestinal donde se desarrolla la *Klebsiella oxytoca* ayudará a tener mayor cuidado en los pacientes hospitalizados que den positivo a la presencia de dicho agente como parte de su microbiota intestinal.

11. Referencias

- Audesirk, T. y Byers B. (2003). *Biología: La vida en la Tierra*. 6° Ed. México. Pearson.
- Arreguín R., González R. y De la Torre A. (2012). Infecciones adquiridas en los hospitales ¿Cuánto cuesta y cómo se calcula?. *Revista Digital Universitaria*, 13(9), 1067-6079.
- Bodero, M. y Munson G. (2009) Cyclic AMP Receptor Protein-Dependent Repression of Heat-Labile Enterotoxin. *American Society for Microbiology*, 77(2), 791-798.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. y Mietzner, T. A. (2011). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 25° Ed. México. McGraw Hill
- Casado, M. (2015). *Regulación de la expresión genética por glucosa*. Real academia Nacional de Farmacia. (<https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/572/589>)
- Castro, A. M. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas*. 2° Ed. México. El Manual Moderno.
- Darby, A., Lertpiriyapong, K., Sarkar, U., Seneviratne, U., Park, D., Gamazon, E.,... Fox, J. (2014). Cytotoxic and Pathogenic Properties of *Klebsiella oxytoca* Isolated from Laboratory Animal. *PLOS ONE*. 9 (7), 1-14.
- De la Cruz, M. A., Ruiz, A., Ares, M. A., Pacheco A., Yáñez, J., Cedillo L., Torres J., y Girón J. (2017). The expression of Longus type 4 pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* is regulated by LngR and LngS and by H-NS, CpxR and CRP global regulators. *Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd*. 19(5), 1761-1775.
- Doi, Y. (2019). Glycerol metabolism and its regulation in lactic acid bacteria. *Springer Berlin Heidelberg*. 1432-0614.
- Dorman, C. (2007). H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* 5, 157-161.
- Dornisch, E., Pletz, J., Glabonjat, R., Martin, F., Lembacher-Fadum, C., Ngere, M.,... Zechner, E. (2017). Biosynthesis of the Enterotoxic Pyrrolobenzodiazepine Natural Product Tilivalline. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. 56, 14753-14757.
- Fonseca, D., Mateus, H. y Contreras N. (2010). *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*. Colombia. Editorial Universidad del Rosario.

- González-y-Merchand, J. A., Estrada-García, I., Colston, M. J y Cox, R. A. (1996). A novel method for the isolation of mycobacterial DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 135(1), 71 – 77.
- Granados, R. y Villaverde, M. del C. (2003). *Microbiología*. Tomo I. Madrid, España. Paraninfo.
- Hartl, D. (2009). *Genetics: analysis of genes and genome*. 7° Ed. United States of America. Jones And Eartlett.
- Haycocks, J., Sharma, P., Stringer, A., Wade, J., y Grainger, D. (2015). The molecular Basis for Control of ETEC Enterotoxin Expression in Response to Environment and Host. *PLOS Pathogens*. 11 (1).
- Jimenez, A. (2003). *Manual de neurogenética*. Madrid, España. Diaz de Santos.
- Koneman, E. W. Y Allen, S. (2013). *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas*. 6° Ed. Buenos Aires, Argentina. Médica panamericana.
- López, F. (2010). *Epidemiología: enfermedades transmisibles y crónico degenerativas*. 3° Ed. México. El Manual Moderno.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica*. 3° Ed. Buenos Aires, Argentina. Médica panamericana.
- Martínez, J. M. (2018). *Estudio de la expresión transcripcional de la fimbria tipo 3 y la cápsula por las proteínas reguladoras MrkH Y RcsA en Klebsiella pneumoniae* (Tesis de licenciatura). UNAM, México.
- Molina, J. (2017) *Factores de patogenicidad bacteriana*. Departamento de microbiología y parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. 2° Ed. Colombia. Universidad de Antioquia.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. y Pfaller, M. A. (2006). *Microbiología médica*. 6° Ed. Madrid, España. Elsevier.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly P., Rodwell V. y Weil A. (2013). *Bioquímica ilustrada de Harper*. 29° Ed. México. McGraw-Hill.

- Nagamura, T., Tanaka, Y., Terayama, T., Higashiyama, D., Seno, S., Isoi, N.,... Ikeuchi H. (2009). Fulminant pseudomembranous enterocolitis caused by *Klebsiella oxytoca*: an autopsy case report. *Acute Medicine & Surgery*. 6, 78-82.
- Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M., Bañó, C. (2007). *Fundamentos de bioquímica*. Madrid, España. Universidad de Valencia.
- Pérez, L. H., Zurita, I. M., Pérez, N., Patiño, N. y Rafael, O. (2010). Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención. *Revista Científica Médica*, 13(2), 90-94. 2077-3323.
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11(4), 589-603.
- PubChem, Open Chemistry Database. (2019). National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tilivalline#section=Top>
- Puerta, A., y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426-3431.
- Puerta J. y Urueña C. (2009). *Prácticas de biología molecular*. Bogota, Colombia. Universidad Javeriana.
- Romero, R., (2007). *Microbiología y parasitología: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3° Ed. México. Médica Panamericana.
- Salazar, A., Sandoval, A. y Armendariz J. (2013). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México. McGraw-Hill.
- Schneditz, G., Rentner, J., Roier, S., Pletz, J., Herzog, K., Bücken, R.,... Zechner, Ellen. (2014). Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic associated colitis. *PNAS*. 111(36), 13181-13186.
- Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K. y Ishihama A. (2011). Novel Roles of cAMP Receptor Protein (CRP) in Regulation of Transport and Metabolism of Carbon Sources. *PLOS ONE*, 6 (6), e20081.
- Singh, L., Cariappa, M. P., y Kaur, M. (2016). *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen?. *Medical Journal Armed Forces India*, 72, 59–61.

- Struthers, J. K., Westran, R. P., (2005). *Bacteriología clínica*. Barcelona, España. Masson.
- Tamay, L., Ibarra, C. y Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2 (2), 70-78.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9° Ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana.
- Tse, H., Gu, Q., Sze, K. H., Chu, I. K., Kao, R. Y., Lee, K. C., Lam, C. W., Yang, D., Tai, S. S., Ke, Y., Chan, E., Chan, W. M., Dai, J., Leung, S. P., Leung, S. Y., Yuen, K. Y. (2017). A tricyclic pyrrolbenzodiazepine produced by *Klebsiella oxytoca* is associated with cytotoxicity in antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *The Journal of biological chemistry*, 292(47), 19503-19520.
- Unterhauser, K., Pörtl, L., Schneditz, G., Kienesberger, S., Glabonjat, R., Kitsera, M.,... Zecchner, E. (2019). *Klebsiella oxytoca* enterotoxins tilimycin and tilivalline have distinct host DNA-damaging and microtubule-stabilizing activities. *PNAS*, 116(9), 3774-3783.
- Varela, G. (2002). *Fisiología y metabolismo bacteriano. Temas de bacteriología y virología médica*. Universidad de la república, Facultad de medicina, Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene.
- Voet, D. (2009). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. 2° Ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana.
- Youn Y., Lee, S. W., Cho, H. H., Park, S., Choung, H. S. & Seo, J. W. (2018). Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis by *Klebsiella oxytoca*: Two Case Reports. *Pediatric Gastroenterology Hepatology & Nutrition*, 21(2), 141-146. Doi: 10-5223/pghn.2018.21.2.141
- Zavala, J. (2005) *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. México. Universidad Autónoma de Yucatán.

12. Anexo

Tabla 19. Pruebas bioquímicas completas. Pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa de *Klebsiella oxytoca* 09-7231.

Pruebas bioquímicas

2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	+	5	IARL	+	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	+	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	+
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Tabla 20. Contenido de los pocillos. Contenido y abreviaturas de las pruebas realizadas.

Pocillo	Análisis	Abreviatura	Cantidad/Pocillo
2	ALA-FE-PRO-ARILAMIDASA	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-PirrolidoniL-ARILAMIDASA	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0.3 mg
7	D-CELOBIOSA	dCEL	0.3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASA	BGAL	0.036 mg
10	PRODUCCIÓN DE H2S	H2S	0.0024 mg
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA	BNAG	0.0408 mg
12	Glutamil Aramidasa Pna	AGLTp	0.0324 mg
13	D-Glucosa	dGLU	0.3 mg
14	GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	GGT	0.0228 mg
15	FERMENTACIÓN/GLUCOSA	OFF	0.45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASA	BGLU	0.036 mg
18	D-MALTOSA	dMAL	0.3 mg
19	D-MANITOL	dMAN	0.1875 mg
20	D-MANOSA	dMNE	0.3 mg
21	BETA-XILOSIDASA	BXYL	0.324 mg
22	BETA-Alanina arilamidasa Pna	BAlap	0.0174 mg
23	L-Prolina-ARILAMIDASA	ProA	0.0234 mg
26	LIPASA	LIP	0.0192 mg
27	PALATINOSA	PLE	0.3 mg
29	Tirosina ARILAMIDASA	TyrA	0.0276 mg
31	UREASA	URE	0.15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
33	SACAROSA	SAC	0.3 mg
34	D-TAGATOSA	dTAG	0.3 mg
35	D-TREALOSA	dTRE	0.3 mg
36	CITRATO (SODIO)	CIT	0.054 mg
37	MALONATO	MNT	0.15 mg
39	5-KETO-D-GLUCONATO	5KG	0.3 mg

40	Alcalinización de –LACTATO	ILATk	0.15 mg
41	ALFA-GLUCOSIDASA	AGLU	0.036 mg
42	Alcalinización de SUCCINATO	SUCT	0.15 mg
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASA	NAGA	0.0306 mg
44	ALFA-GALACTOSIDASA	AGAL	0.36 mg
45	FOSFATASA	PHOS	0.504 mg
46	Glicina ARILAMIDASA	GlyA	0.12 mg
47	ORNITINA DESCARBOXILASA	ODC	0.3 mg
48	LISINA DESCARBOXILASA	LDC	0.15 mg
52	BASE DESCARBOXILASA	ODEC	N/C
53	Asimilación de L-HISTIDINA	IHISa	0.087 mg
56	CUMARATO	CMT	0.126 mg
57	BETA-GLUCURONIDASA	BGUR	0.0378 mg
58	RESISTENCIA O/129 (comp. Vibrio.)	O129R	0.0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARILAMIDASA	GGAA	0.0576 mg
61	Asimilación de L-MALONATO	IMLTa	0.042 mg
62	RLLMAN	ELLM	0.03 mg
64	Asimilación de L-LACTATO	ILATa	0.186 mg

Tabla 21. Tabla de sensibilidad. Pruebas de sensibilidad realizadas.

Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
BLEE	NEG	-	Cefepima	<=1	S
Ampicilina	>=32	R	Ertapenem	<=0.5	S
Ampicilina/Sulbactam	16	I	Meropenem	<=0.25	S
Cefalotina	8	S	Amicacina	<=2	S
Cefuroxima			Gentamicina	<=1	
Oral	4	S	Ciprofloxacino	<=0.25	S
Oral	4	S	Norfloxacino	<=0.5	S
Cefuroxima Axetil	4	S	Fosfomicina	64	R
Cefuroxima	<=1	S	Nitrofurantoína	<=16	S
Ceftazidima	<=1	S	Trimetoprima/Sulfametoxazol	<=20	S
Ceftriaxona	<=1	S			