



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

Identificación de *Klebsiella pneumoniae* a través
de lipopolisacáridos usando el sistema de
ELISA-Polimixina

TESIS PROFESIONAL
para obtener el título de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
José Ricardo Aguilar Bañuelos

Director de tesis

Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor

M.C. Maurilio Flores Pimentel





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.

Agradecimientos

A mi Sensei y Director de Tesis: **Dr. Rubén Marroquín**, gracias por aceptarme en su laboratorio y tener siempre la disposición de compartir su conocimiento, gracias por ser una excelente persona. Mi admiración y respeto.

A mi Asesor: **M. C. Maurilio Flores**, por la ayuda ofrecida para este trabajo y por presionarme de vez en cuando.

A mis sinodales: **Mtra. Yolanda Flores, M. en C. Juana Rosado y Q.F.B. Gabriel Romero**, por mejorar este trabajo con sus correcciones.

Al **Q.F.B. Armando Ramírez**, por su apoyo en este trabajo y por su valiosa amistad.

Al **Dr. Luis Mora** y a mis compañeros del laboratorio, gracias por el buen trato y por las galletas.

A la **Maestra Paty Vidal**, por ayudarme a creer más en mí y por su amistad.

Al **M. en C. José Luis Trejo** por su amistad y apoyo.

A mi amada Familia

Mis Padres: Alberto Aguilar y Celia Bañuelos, gracias por ser los mejores padres, por toda su valiosa enseñanza, por tolerar mis defectos y apoyarme a pesar de mis errores; y, a riesgo de sonar pueril, espero algún día ser tan genial como ustedes. Gracias por sus cuidados y por ser ejemplo inspirador, por darme todo lo que necesitaba y no todo lo que quería, pues así aprendí a valorar cada cosa que ustedes, con amor, me regalaban. Mi eterno agradecimiento.

Mis hermanos: Tobe, por sus enseñanzas; **Pablo**, por su ayuda durante toda la carrera; **Sandy**, por su apoyo y por confiar en mí, incluso pareciendo a veces ser mayor que yo. También a **Lucy** y a **Lalo**, que son como mis hermanos.

A mi amada **Eli**, gracias por ser luz y respiro en mi vida, por compartir este camino conmigo. Gracias por todo el apoyo durante casi 10 años, por escuchar, por tus palabras, por hacerme una mejor persona, gracias por amarme tanto como yo a ti.

A mi Shifu **Carlos Acatitla**, y a **Magally Bulnes**, gracias por el arte marcial y por su amistad, por enseñarme que existe una mejor forma de vivir, conocerlos fue un evento que marco mi vida.

A todos los buenos amigos que hice durante la carrera y la tesis, en especial a mi **Grupo de Clínicos** con quienes pase un año excelente y, a **Fer** y **Nacho** por su amistad y compañía durante estos años.

A **Dios**, por cada latido y por permitirme estar rodeado de todas estas maravillosas personas que han enriquecido mi vida.

Contenido	Página
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
2.1.1 Características morfológicas y bioquímicas	3
2.1.2 Infecciones causadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.1.3 Resistencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a antibióticos	6
2.2.4 Factores de virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.1.5 Lipopolisacárido	8
2.1.6 Estructura química del lipopolisacárido	9
2.1.7 Respuesta inmune contra el lipopolisacárido	15
2.2 Filtración en gel	16
2.3 Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	17
2.3.1 Materiales y procesos para ELISA	17
2.3.2 ELISA-polimixina	18
2.4 Sistema de identificación bacteriana VITEK	19
3. Planteamiento del problema	23
4. Objetivos	24
5. Hipótesis	25
6. Material y método	26
7. Resultados	37
8. Discusión	44
9. Conclusiones	46
10. Propuestas y recomendaciones	47
11. Referencias	48

1. INTRODUCCIÓN

A través de los años *Klebsiella pneumoniae* se ha caracterizado por infectar a personas hospitalizadas o que sufren enfermedades crónicas, en las que se incluyen diabetes, hipertensión, deficiencias pulmonares, etc; incluso se tiene una elevada incidencia de esta bacteria en recién nacidos de la República Mexicana, presentándose más en bebés prematuros, en los que causa septicemias que frecuentemente pueden llevar a la muerte. En cuanto a su presencia en enfermedades de la comunidad, *Klebsiella pneumoniae* comúnmente provoca infecciones de vías urinarias que pueden complicarse y provocar septicemias, asimismo esta bacteria es agente causal de infecciones en vías respiratorias que llevan a neumonía, y sumado a estos hechos, *Klebsiella pneumoniae* ha desarrollado gran resistencia a antibióticos, pues se reporta que desde los años setenta esta bacteria Gram negativa ha generado resistencia a diversos tratamientos antimicrobianos. Conjuntamente, la resistencia es transmitida por plásmidos lo que facilita su diseminación, y con ello las terapias microbianas se vuelven cada vez menos eficaces teniendo que recurrir a tratamientos más costosos. Estas dos características marcan a *Klebsiella pneumoniae* como una bacteria que provoca preocupación constante como agente infeccioso en los hospitales, por lo que su identificación debe ser pronta y certera, además de realizarse por un método no muy costoso, para que el médico pueda administrar el tratamiento adecuado. Es de suma importancia que *Klebsiella pneumoniae*, junto al resto de bacterias Gram negativas de alta incidencia en infecciones nosocomiales, sea identificada por un método rápido, para ello en el presente trabajo se propone una nueva opción en la gama de posibilidades para la identificación de *Klebsiella pneumoniae*: el sistema ELISA-Polimixina; en comparación con el sistema VITEK, mismo que ha demostrado gran certeza y rapidez en la identificación de bacterias de interés clínico, además de ser un sistema de manejo sencillo y cómodo para el trabajo en el laboratorio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo perteneciente al género *Klebsiella* que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, esta familia, formada por gran cantidad de especies bacterianas, crece en ambientes de aerobiosis y anaerobiosis y son biota normal en gran número de animales. *Klebsiella pneumoniae* es ubicua en la naturaleza. Probablemente tiene dos hábitats comunes: el medio ambiente, en el cual se halla en aguas superficiales y residuales, en el suelo y sobre las plantas; y las superficies mucosas de mamíferos, además de estar presente en vías respiratorias superiores y en las heces de casi 5% de las personas sanas. ¹⁻³

Klebsiella pneumoniae está presente de forma natural en muchos ambientes acuáticos y pueden multiplicarse y alcanzar concentraciones elevadas en aguas ricas en nutrientes, como residuos de fábricas de papel, plantas de acabado textiles y operaciones de procesado de caña de azúcar. Estos microorganismos pueden proliferar en sistemas de distribución de agua, y se sabe que colonizan los anillos de los grifos. Asimismo su amplia distribución en ambientes variados coincide con su elevada incidencia en animales domésticos y salvajes, y como agente coliforme primario de mastitis en vacas lecheras. ¹⁻³

2.1.1 Características morfológicas y bioquímicas

K. pneumoniae es una bacteria Gram negativa de forma bacilar, que favorece su proliferación en condiciones de 37° C, pH de 7 y presión osmótica de 1 atm. Este bacilo muestra un aspecto pegajoso y brillante, con crecimiento mucoso debido a la presencia de cápsula, estructura bacteriana de la que se han hallado 70 tipos diferentes para el género *Klebsiella*, algunos con reactividad cruzada con otras especies como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. En el medio *Salmonella-Shigella* exhibe tonalidad rosada pues acidifica el medio gracias a su capacidad fermentativa; en medio eosina-azul de metileno las colonias se presentan con tonalidad rosa-púrpura; en caso de que sea sembrada en agar McConkey las colonias serán rosadas, tonalidad conseguida por la presencia de β -galactosidopermeasa y β -galactosidasa; conjuntamente, *K. pneumoniae* no produce hemólisis en agar sangre.^{4,5}

K. pneumoniae es una bacteria anaerobia facultativa, es decir, que es capaz de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, es inmóvil, su porcentaje de guanina-citosina en ADN oscila entre el 53 y el 58% y sus resultados para Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y citrato (IMViC) son -/+/+; para expresar de manera sencilla características metabólicas necesarias para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* se elaboró el cuadro 2.1.1.^{4,5}

Cuadro 2.1.1 Características bioquímicas de *Klebsiella pneumoniae* de acuerdo a Rojas 2006⁴

Prueba	Resultado
Indol	Negativo
Rojo de Metilo	Negativo
Voges Proskauer	Positivo
Citrato	Positivo
Sulfuro de Hidrógeno (H ₂ S)	Negativo
Urea	Positivo
Fenilalanina	Negativo
Lisina	Positivo
Arginina	Negativo
Ornitina	Negativo
Movilidad a 36° C	Negativo
Hidrólisis de gelatina	Negativo
Gas a partir de glucosa	Positivo
Lactosa	Positivo
Sacarosa	Positivo
Manitol	Positivo
Dulcitol	Variable
Adonitol	Positivo
Sorbitol	Positivo
Arabinosa	Positivo
Rafnosa	Positivo
Ramnosa	Positivo
Xilosa	Positivo
Melobiosa	Positivo
ONPG	Positivo

2.1.2 Infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae*

Las infecciones por *K. pneumoniae* pueden presentarse en casi cualquier lugar del cuerpo, siendo el tracto urinario y el respiratorio los más comunes; la mayoría de las infecciones por *K. pneumoniae* están asociadas al ambiente hospitalario, aumentando radicalmente el número de portadores en estos sitios y la colonización en el paciente se asocia significativamente con padecimientos como la diabetes mellitus, la obstrucción pulmonar crónica o algún grado de deficiencia en el sistema inmune, además de presentarse una predisposición en pacientes recién operados; aunque en los continentes asiático y africano persisten como importantes causantes de neumonía y bacteriemia adquiridas en la comunidad. Estas infecciones están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad.^{1,6,7}

Se estima que *K. pneumoniae* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa (*Ko et al 2002*), por tanto esta bacteria se sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. En México *Klebsiella pneumoniae* permanece como un agente causal de alta incidencia en lo que respecta a bacteremias, asimismo, se ha encontrado en el 31% de los hemocultivos de muestras procedentes de niños con enfermedad nosocomial (*Ávila et al 1999*); incluso se ha observado que esta bacteria infecta a gran porcentaje de recién nacidos prematuros o de bajo peso.^{1,8-11}

Klebsiella pneumoniae causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías además de ser el segundo agente causal, después de *Escherichia coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram-negativas; también es causa de infecciones de tejidos blandos, e infecciones en heridas quirúrgicas; conjuntamente *K. pneumoniae* ha sido de interés como agente causal de absceso hepático piogénico, que es una enfermedad con mortalidad por arriba de 31% (*Chan et al 2007*). Las terapias antimicrobianas, además, han sido a menudo responsables del surgimiento de bacterias resistentes a múltiples antibióticos en hospitales, lo cual ha generado un renovado interés en el estudio de *K. pneumoniae* como agente infeccioso.^{1,12-14}

2.1.3 Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a antibióticos

A lo largo de los años la humanidad se ha enfrentado a nuevos retos en el campo de los antibióticos pues gran número de bacterias, en especial Gram negativas, han desarrollado resistencia a las terapias antimicrobianas. En los años setenta las cepas de *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes, lo eran a aminoglucósidos (gentamicina, estreptomycin, etc.) principalmente, pero desde los años ochenta, han proliferado reportes de brotes nosocomiales causados por bacterias Gram negativas resistentes, productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (Sirov et al 1987).¹⁵⁻¹⁹

Las beta-lactamasas de espectro extendido son enzimas de codificación plasmídica que han sustituido de uno a tres aminoácidos por lo que son capaces de hidrolizar un buen número de antibióticos, entre ellos las amino y ureidopenicilinas incluyendo también a las cefalosporinas de segunda y tercera generación (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona). *Klebsiella pneumoniae* presenta esta característica de resistencia que al ser transmitida por plásmidos provoca que se diseminen con facilidad, al mismo tiempo, la diseminación de la resistencia a las cefalosporinas de cuarta generación y monobactámicos limita aún más el uso de los antimicrobianos disponibles y estimula el uso de antibióticos más costosos y de mayor espectro; y por último, estas cepas resistentes pueden no ser detectadas mediante los procedimientos microbiológicos de rutina y pueden generar por tanto fallas terapéuticas frecuentes y en ocasiones fatales.¹⁷⁻²²

2.1.4 Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*

Los principales factores de virulencia asociados a esta bacteria son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas, los sideróforos y el lipopolisacárido, todos ellos tienen gran importancia y su acción conjunta es lo que da como resultado la patogenicidad de la bacteria. Los factores de virulencia tienen como objetivo lograr que la bacteria entre y se multiplique en el interior del hospedador, resista su sistema inmune (o simplemente no lo estimule) y le produzca un daño; una de las características más notorias de *K. pneumoniae* es la presencia de la cápsula.^{1, 4, 5}

La cápsula es una estructura superficial que está formada por exopolisacáridos complejos que recubren la superficie bacteriana formando envolturas gruesas protegiéndola de la opsonofagocitosis, proporcionando una barrera física que impide la interacción entre las opsoninas del complemento y los receptores del complemento de las células fagocíticas; al mismo tiempo, la cápsula protege a la bacteria de la acción bactericida del suero enmascarando las moléculas de la superficie bacteriana sobre las cuales se deposita el componente C3 de la cascada de complemento.^{23, 24}

Klebsiella pneumoniae posee también proyecciones filamentosas no flagelares que se encuentran en la superficie de la bacteria y están compuestas de subunidades protéicas globulares, estas estructuras son llamadas fimbrias y son útiles en la adhesión y la colonización de las mucosas en el hospedador. De los diferentes tipos de fimbrias descritos para las enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae* produce principalmente: a) tipo 1, que permite la unión de trisacáridos de manosa de las glicoproteínas del hospedador, permitiendo la unión de esta al mucus o células epiteliales del tracto urogenital, respiratorio e intestinal; b) tipo 3, que le dan la capacidad de adherirse a células endoteliales, al epitelio del tracto respiratorio y a células uroepiteliales, en los riñones estas fimbrias median la adhesión bacteriana a las membranas basales tubulares, a las cápsulas de Bowman y a los vasos renales.^{1, 5, 25}

Además, *Klebsiella pneumoniae* cuenta con sideróforos, que son quelantes de hierro de alta afinidad y bajo peso molecular, que son necesarios para que la bacteria obtenga el hierro que se halla intracelularmente unido a proteínas como la hemoglobina, ferritina, hemosiderina y mioglobina, o extracelularmente unido a transferrina y lactoferrina. Entre los factores de virulencia, el más importante para el presente estudio es el lipopolisacárido, pues es el antígeno clave para el ensayo ELISA-Polimixina.^{1, 25}

2.1.5 Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un complejo glucolipídico anclado a la membrana externa de los ribosomas adheridos, está constituido por el lípido A, el cual está unido covalentemente a una fracción polisacárida, que consta de dos regiones, el núcleo del lipopolisacárido y la cadena lateral O también llamado antígeno O. El carbohidrato central y el lípido A, en contraste con el antígeno O, son esencialmente invariantes y actúan como el blanco para el enlace por dos proteínas séricas humanas llamadas proteína fijadora de LPS y CD14 soluble; los complejos que forman estas proteínas con el LPS sobre una superficie bacteriana son de fácil reconocimiento, a su vez, por los receptores de las células endoteliales, neutrófilos, monocitos, y otros tipos celulares de los humanos, todo esto facilita el enlace y la destrucción de las bacterias Gram negativas.^{1, 26, 27}

El Lipopolisacárido, además, es liberado durante la división o muerte bacteriana y es capaz de interactuar con diversos receptores expresados por células diana del LPS, como granulocitos, linfocitos y, en particular, monocitos y macrófagos; en respuesta al LPS, estas células secretan mediadores endógenos con diversas actividades que provocan los efectos típicos de las endotoxinas y que, en última instancia, pueden dar lugar a un shock irreversible conocido como shock séptico o endotoxemia.^{1, 18, 25, 27}

La presencia de LPS es necesaria para la función de muchas membranas proteínicas externas en las bacterias Gram negativas, pues la cara exterior de la membrana externa está constituida principalmente por LPS orientado de forma que el componente hidrófobo de éste forma la parte exterior de la bicapa lipídica y queda oculto por los componentes polisacáridos de la molécula. Esta situación hace que el LPS esté en contacto directo con el exterior, de manera que constituye el antígeno superficial más importante de las bacterias Gram-negativas y es uno de los principales blancos tanto de bacteriófagos como de los sistemas de defensa del organismo hospedador. El componente esencial que conduce a la generación de estos efectos es la parte lipídica del LPS, el lípido A, y por ello el LPS es también conocido como endotoxina, que es una toxina termoestable encontrada dentro de la bacteria y provoca fiebre e inflamación. Para *K. pneumoniae* se han descrito once estructuras diferentes en su antígeno O que pueden ser diferenciadas por métodos inmunológicos, aunque algunas similitudes estructurales producen reactividad cruzada de forma que el número actual de serotipos diferentes es de nueve: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12. El serotipo O1 es el antígeno O más comúnmente hallado en los aislados clínicos de *K. pneumoniae* (Hansen et al. 1998).^{1, 18, 25, 27}

2.1.6 Estructura química del Lipopolisacárido

En la mayoría de las bacterias Gram negativas la estructura del lipopolisacárido sigue el mismo principio, una parte polisacárida (polar) unida covalentemente a una porción lipídica (apolar), denominada lípido A. Esta porción se conserva en diversas bacterias Gram negativas y se sitúa donde habitualmente se encuentran los fosfolípidos que forman las membranas biológicas, permitiendo el anclaje de la molécula del LPS a la membrana externa de la bacteria (Fig. 1).^{1, 28}

Generalmente en las bacterias Gram negativas la fracción polisacáridica consta de dos partes, una fracción más interna, y que es similar en todas las especies que la presentan, conocida como núcleo del LPS y una más externa y variable denominada cadena lateral O, también llamado antígeno O por sus propiedades inmunogénicas; el núcleo del lipopolisacárido representa el punto de anclaje al cual se une el antígeno O y se divide a su vez en núcleo interno y núcleo externo.^{1, 28}

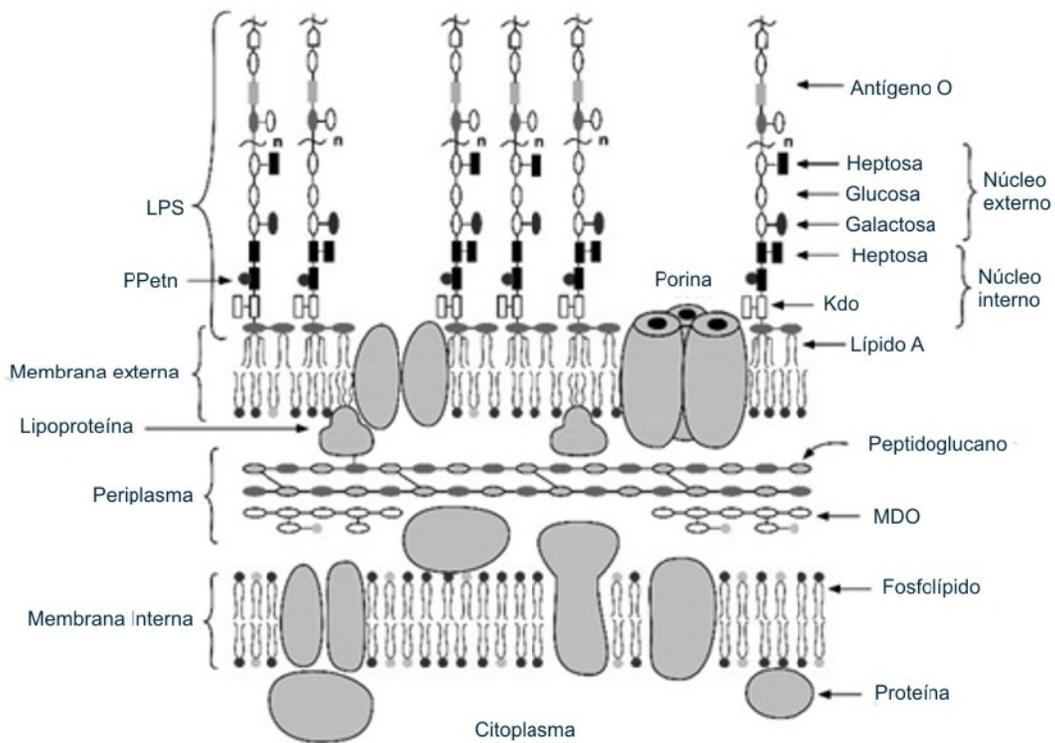


Fig. 1 Modelo molecular de las membranas interna y externa, de *Escherichia coli* de acuerdo a Raetz et al., 1991²⁸. Abreviaciones: PPetn (Pirofosfato de etanolamina), LPS (lipopolisacárido), Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxioctónico)

Lípido A

El lípido A consiste en unidades del disacárido fosforilado al cual están unidos varios ácidos grasos de cadena larga, el ácido beta hidroximirístico, un ácido graso con 14 átomos de carbono siempre está presente y es exclusivo de este lípido; los otros ácidos grasos, junto con los grupos sustitutos en los fosfatos, varían según la especie bacteriana (Fig.2).^{1, 4, 5, 18, 29}

El lípido A, así como la parte interna del núcleo, es la región más conservada en el LPS de las bacterias Gram negativas; pueden existir, sin embargo, pequeñas variaciones de especie a especie que afecten a sus propiedades biológicas; el elevado grado de conservación de esta molécula refleja su importante papel en el mantenimiento de la membrana externa, ya que es el principal responsable de su ensamblaje e interactúa de forma muy específica con algunas de las proteínas presentes en esta membrana. Por todo esto, su presencia es indispensable para el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas estudiadas hasta ahora.^{1, 4, 5, 18, 29}

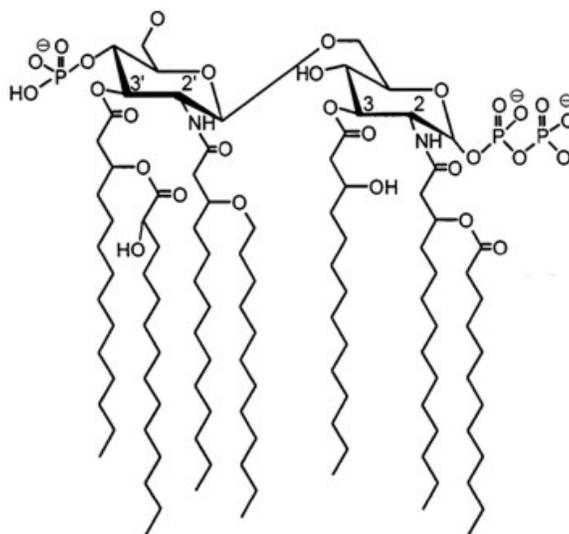


Fig. 2 Estructura química del Lípido A de acuerdo con Ohno y Morrison 1989²⁹, es importante señalar que se considera que el lípido A tiene una estructura muy similar en todas bacterias Gram negativas.

El núcleo del Lipopolisacárido

El núcleo del LPS consiste en un oligosacárido heterogéneo de variabilidad restringida unido directamente al lípido A en la posición 6', que se encuentra presente en todas las bacterias Gram-negativas estudiadas hasta el momento (Fig. 3). El núcleo del LPS no se considera un factor de virulencia como tal, aunque se ha demostrado su relación con la adhesión a células del hospedador y con un aumento de actividad biológica de la endotoxina. También se ha observado que el núcleo de LPS es una estructura bien conservada entre géneros y familias, lo cual es un indicativo de su importancia como estabilizador de la membrana. Asimismo, el núcleo de LPS sirve de anclaje al antígeno O, el cual es esencial para el mantenimiento de la membrana externa.^{1, 29, 30}

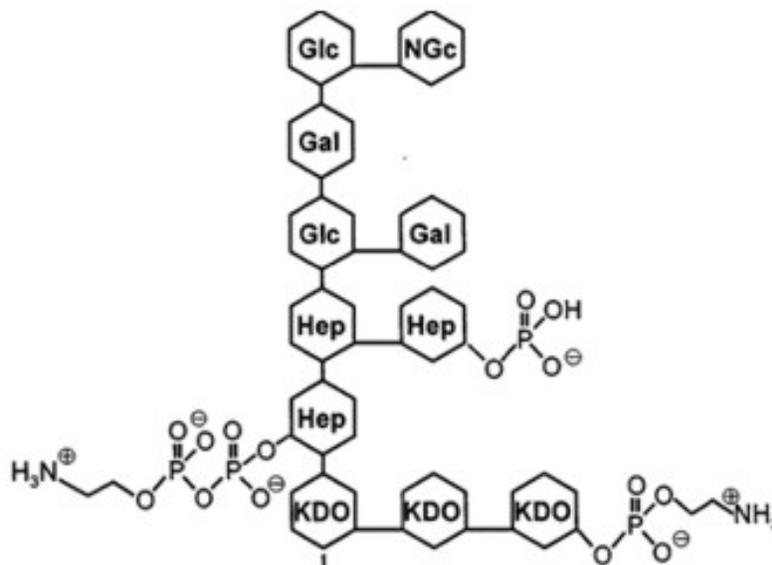


Fig. 3 Estructura química del núcleo de LPS de E. coli O111:B4 según Ohno y Morrison 1989²⁹. Abreviaturas: L-glicerol-D-mano-heptosa (Hep); galactosa (Gal); glucosa (Glc); (KDO) ácido 2-ceto-3-deoxioctónico; N-acetil-galactosamina (NGa); N-acetil-glucosamina (NGc).

El antígeno O

El antígeno O llamado también cadena lateral O es un polisacárido repetitivo expuesto en la superficie bacteriana unido normalmente a un residuo terminal del núcleo externo; este polisacárido consiste en una serie de repeticiones, generalmente entre 10 y 30, de una unidad oligosacáridica básica (Fig. 4).^{1, 4, 5, 18, 25, 31}

El antígeno O es la parte más externa del LPS y a su vez la más inmunogénica y variable, ésta variabilidad puede ser detectada por métodos inmunológicos, lo cual ha permitido agrupar las cepas de una especie bacteriana en diferentes serotipos. El antígeno O del LPS está considerado como un factor importante de virulencia bacteriano, puesto que dota a la bacteria de una capa superficial hidrófila que puede enmascarar importantes epítomos antigénicos conservados presentes en la membrana externa bacteriana. Sin embargo, la principal característica del antígeno O es su capacidad de conferir resistencia al efecto bactericida del suero en aquellas bacterias que lo presentan, en función de la cantidad de moléculas de LPS cubiertas con cadena lateral O, así como de la composición y la longitud de las cadenas polisacáridicas.^{1, 4, 5, 18, 25, 31}

La diversidad estructural de los antígenos O es extraordinaria y han sido hallados más de 60 monosacáridos diferentes y 30 componentes no glicosídicos formando parte de antígenos O de diversas bacterias. Las subunidades repetitivas que forman los antígenos O pueden diferir en los monómeros que las forman, en la posición y la estereoquímica de los enlaces O-glicosídicos, y en la presencia o la ausencia de sustituyentes no glicosídicos. Además, estas subunidades pueden estar formadas por un sólo tipo de azúcar (formando homopolisacáridos) o por varios (formando heteropolisacáridos), y pueden ser lineales o ramificadas. Asimismo, las sustituciones no estequiométricas y otras modificaciones juegan un importante papel en la

antigenicidad de la cadena lateral O, de forma que adiciones de grupos acetil o de residuos de glucosa y modificaciones de los enlaces entre residuos pueden variar el serotipo de la bacteria. En muchos casos, estas modificaciones están ligadas a la presencia de bacteriófagos lisogénicos o crípticos que codifican para enzimas que alteran la biosíntesis del antígeno O. ^{1, 4, 5, 18, 25, 31}

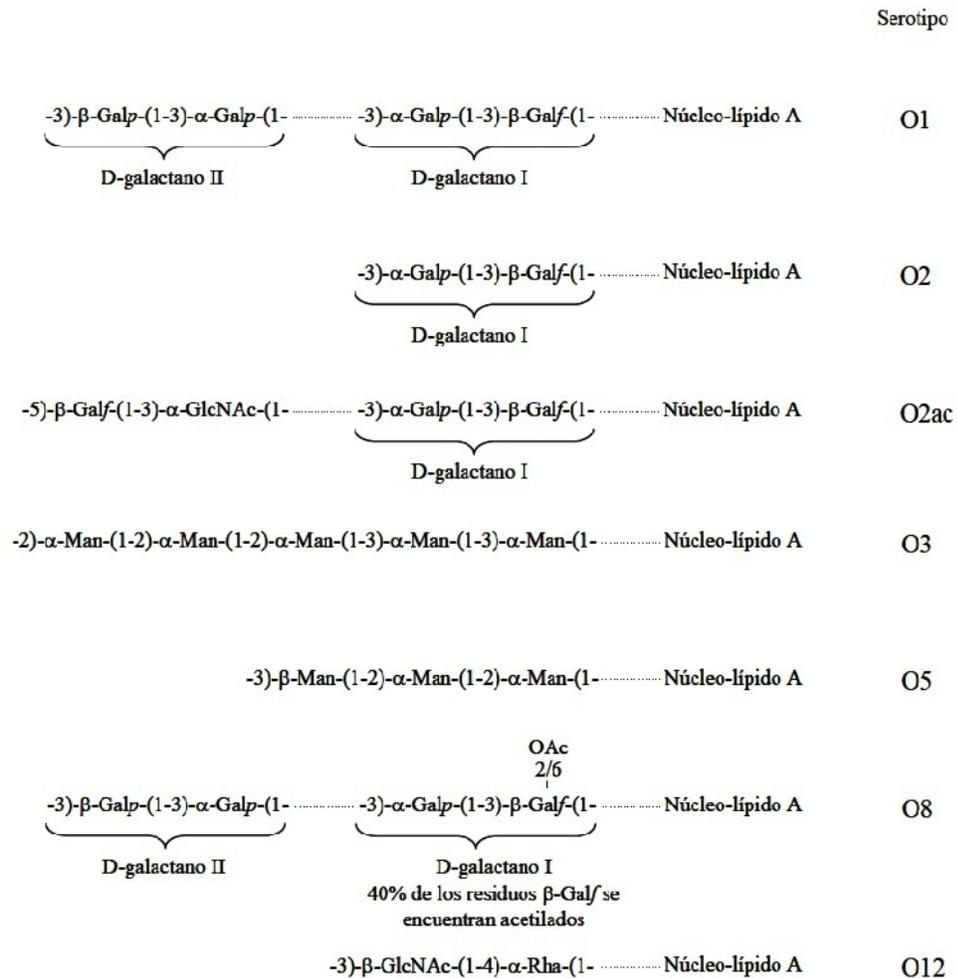


Fig. 4 Estructura química del antígeno O de varios serotipos de *Klebsiella pneumoniae*. En cada caso están representadas las unidades repetitivas básicas. En los casos de O1, O2ac y O8, el antígeno O está formado por dos dominios con una subunidad repetitiva diferente de acuerdo a Vinogradov et al. 2002 ³¹.

La IgM es la primer inmunoglobulina en producirse durante una respuesta inmune, ya que los linfocitos B que reconocen los epítomos del LPS se diferencian en células plasmáticas y sintetizan cadenas pesadas μ , las cuales se combinan con cadenas ligeras dando como resultado IgM. Debido a su gran tamaño este isotipo se encuentra en particular en el espacio intravascular y al tratarse de un pentámero tiene un alto peso molecular (950.000 Daltons), característica que permite separar a esta inmunoglobulina por filtración en gel.³²⁻³⁴

2.2 Filtración en gel

La filtración en gel es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de moléculas de acuerdo a su tamaño, en este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un gel, que se introduce en una columna como soporte; el gel está constituido por partículas esféricas que tienen poros, cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de los poros, las moléculas de pequeño tamaño difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retardadas en su paso por la columna. Las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas del gel y por ello eluyen rápidamente en lo que se denomina “volumen de exclusión” de la columna, se dice que son excluidos del gel. De esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular (Figura 6).^{35, 36}

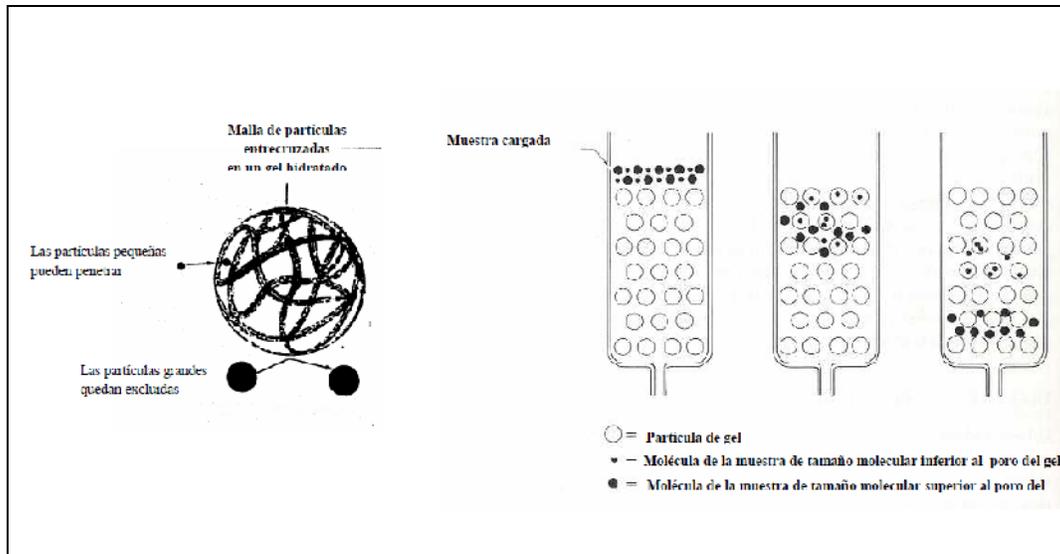


Figura 6. Filtración en gel ³⁶

2.3 Análisis de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA (por sus siglas en inglés "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") es una técnica inmunológica de gran aplicación y fácil manejo, pues no es necesario equipo muy sofisticado y costoso para cuantificar los resultados; esta técnica se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima y el otro inmovilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable, incluso a simple vista, o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. ^{32-34, 37, 38}

2.3.1 Materiales y procesos para ELISA

La técnica ELISA requiere una fase sólida que debe permitir un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y la reproducibilidad de la unión de antígenos o anticuerpos sobre su superficie. Las microplacas de 96 pocillos y un

volumen de 350 μ L son especialmente ventajosas para procesar un elevado número de muestras y una vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo siempre que se mantenga seco y a baja temperatura.^{32-34, 37, 38}

Normalmente se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles con o sin tapa. Debe realizarse el pegado del antígeno o anticuerpo, que comúnmente se realiza adicionando a la placa una dilución del antígeno o anticuerpo en amortiguador de carbonato (pH 9,6) e incubando posteriormente durante 3 horas a 37° C o 16 horas a 4° C; también puede ser tratada a 40-50° C en tampón fosfato (PBS) o en agua fisiológica amortiguada pH 7,2-7,4 hasta desecación. Para los lavados se requiere el uso de una solución amortiguadora salina con un agente tensoactivo, por lo general se utiliza PBS (solución amortiguadora salina de fosfatos) con Tween 20. En lo que se refiere a la enzima unida al anticuerpo, es posible elegir entre algunas opciones que tienen ventajas y desventajas, entre ellas destaca la peroxidasa debido a su bajo costo y gran aplicación.^{32-34, 37, 38}

Existen diferentes tipos de ELISA, en caso de tratarse de un anticuerpo marcado pueden nombrarse: 1) ELISA directo, 2) ELISA indirecto, 3) ELISA sandwich, dentro de éste último existen dos tipos el doble y el heterólogo. Cuando el antígeno es el que está unido a la enzima se trata de un ELISA competitivo. Entre la gama de posibilidades de ELISA se encuentra ELISA-Polimixina.^{32-34, 37, 38}

2.3.2 ELISA-Polimixina

El sistema ELISA-Polimixina fue desarrollado para la detección de *Escherichia coli* 0111 y 026 en carne molida, y se basa en la afinidad que existe entre los lipopolisacáridos, presentes en todas las bacterias Gram negativas, y la polimixina B.^{13, 14}

La polimixina B es un polipéptido catiónico producido por *Bacillus polymyxa* que actúa específicamente en las bacterias Gram negativas, por interacciones hidrófobas y electroestáticas con la pared de la bacteria, más específicamente con fosfolípidos y lipopolisacáridos, en especial con el lípido A con quien forma un complejo estable, además se ha mostrado que la polimixina B y el lipopolisacárido guardan una relación

estequiométrica, pues muchas evidencias sugieren que una molécula de polimixina B se pega a la una sola unidad monomérica de LPS .³⁹⁻⁴²

ELISA-Polimixina se ofrece como una alternativa a la manera clásica del anticuerpo o el antígeno inmovilizado en la superficie de poliestireno; pues utiliza la polimixina como un adsorbente de alta afinidad para fijar al lipopolisacárido. Básicamente, ELISA-Polimixina funciona del siguiente modo: la polimixina se pega a un soporte, se agrega la muestra y se espera la interacción de las dos sustancias, una vez fijado el lipopolisacárido a la polimixina, se adiciona el conjugado específico para el lipopolisacárido y así es posible observar la presencia de este en la muestra tras la adición del sustrato; por supuesto para evaluar la efectividad de este método es necesario compararlo con un sistema de identificación bacteriana que goce de gran confiabilidad, y para ello se utiliza el sistema VITEK.³⁹⁻⁴²

2.4 Sistema VITEK

A lo largo de dos décadas se han desarrollado y comercializado sistemas de identificación bacteriana, pero pocos de ellos están actualmente disponibles en el mercado. El sistema VITEK es un sistema automatizado de identificación bacteriana y de sensibilidad antimicrobiana, que está basado en nuevas tecnologías fundamentadas en la fluorescencia; y los estudios realizados para evaluar su efectividad afirman que es capaz de identificar correctamente un 95% de las muestras de bacterias Gram negativas (*Ling et al 2001*). La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión del microorganismo en tarjetas con 64 pocillos, cada uno de estos contiene un sustrato específico, evaluando acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimática y crecimiento en presencia de sustancias inhibidoras. Cada tarjeta cuenta con un tubo de transferencia previamente insertado para que se realice la inoculación. Las lecturas se realizan gracias a un sistema óptico que trabaja con varias longitudes de onda del espectro visible, midiendo así, turbidez y productos coloreados del

metabolismo de algún sustrato. Además el aparato utiliza un algoritmo para eliminar lecturas falsas que se presentan cuando hay pequeñas burbujas.⁴³⁻⁴⁷

La base de datos del sistema VITEK está construida con el objetivo de identificar adecuadamente a las bacterias, los datos obtenidos son comparados con la base de datos para ofrecer un valor de proximidad y así saber que certeza se tiene en la identificación de la bacteria, basándose en el siguiente cuadro:⁴³⁻⁴⁷

Cuadro 2.4.1 Niveles de identificación del sistema VITEK de acuerdo a *Pincus 2005*⁴³

Nivel de confianza de identificación	Elecciones	% de probabilidad	Comentarios
Excelente	1	96 a 99	Ninguno
Muy bueno	1	93 a 95	Ninguno
Bueno	1	89 a 92	Ninguno
Aceptable	1	85 a 88	Ninguno
Baja discriminación	2 a 3	Suma de elecciones = 100; el porcentaje de probabilidad de cada elección refleja el número asociado con cada elección	2 ó 3 taxa exhiben el mismo patrón, pueden ser separados por pruebas complementarias.
Organismo no identificado	>3 ó 0	Ninguno	Más de 3 taxa exhiben el mismo patrón o un patrón muy atípico, que no corresponde con ningún taxón de la base de datos, hay que revisar la tinción

Para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* es necesario utilizar la tarjeta de identificación Gram negativos (GN). La tarjeta GN es utilizada para la identificación de 135 especies de los más comunes bacilos Gram negativos, ya sean fermentadores o no fermentadores. La identificación final resulta en 10 horas o menos, gracias a que se realizan las pruebas mostradas en el cuadro 2.4.1:⁴³⁻⁴⁷

Cuadro 2.4.2 Pruebas en la tarjeta de Gram negativos *Pincus 2005* ⁴³

Pozo	Prueba	Mnemónico
2	Ala-fenil-Pro-ARILAMIDASA	APPA
3	ADONITOL	ADO
4	L-Pirrolidonil-ARILAMIDASA	PyrA
5	L-ARABITOL	IARL
7	D-CELOBIOSA	dCEL
9	BETA-GALACTOSIDASA	BGAL
10	PRODUCCIÓN DE H ₂ S	H ₂ S
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA	BNAG
12	Glutamil Arilamidasa pNA	AGLTp
13	D-GLUCOSA	dGLU
14	GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	GGT
15	FERMENTACIÓN/GLUCOSA	OFF
17	BETA GLUCOSIDASA	BGLU
18	D-MALTOSA	dMAL
19	D-MANITOL	dMAN
20	D-MANOSA	dMNE
21	BETA-XILOSIDASA	BXYL
22	BETA Alanina arylamidasa pNA	BAlap
23	L-Prolina ARILAMIDASA	ProA
26	LIPASA	LIP
27	PALATINOSA	PLE
29	Tirosina ARILAMIDASA	TyrA
31	UREASA	URE
32	D-SORBITOL	dSOR
33	SACAROSA	SAC
34	D-TAGATOSA	dTAG
35	D-TREHALOSA	Dtre
36	CITRATO (SODIO)	CIT
37	MALONATO	MNT
39	5-CETO-D-GLUCONATO	5KG
40	L-LACTATO alcalinización	ILATk
41	ALFA-GLUCOSIDASA	AGLU
42	SUCCINATO alcalinización	SUCT
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSIAMINIDASA	NAGA
44	ALFA-GALACTOSIDASA	AGAL
45	FOSFATASA	PHOS
46	ARILAMIDASA Cíclica	GlyA
47	ORNITINA DESCARBOXILASA	ODC
48	LISINA DESCARBOXILASA	LDC
52	DESCARBOXILASA	ODEC
53	L-HISTIDINA asimilación	IHISa
56	CUMARATO	CMT
57	BETA-GLUCORONIDASA	BGUR
58	O/129 RESISTENCIA (comp. vibrio.)	O129R
59	Glu-Gly-Arg-ARILAMIDASA	GGAA
61	L-MALATO asimilación	IMLTa
62	ELLMAN	ELLM
64	L-LACTATO asimilación	ILATa

Al saber que el sistema VITEK ofrece una alternativa confiable en la identificación de bacterias Gram negativas, es posible utilizarlo como método de referencia en la identificación de *Klebsiella pneumoniae* y su comparación con el sistema ELISA-Polimixina.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Klebsiella pneumoniae es un patógeno común causante de infecciones en el sistema urinario y respiratorio, y en casos más severos provoca septicemia; pero la principal prevalencia es en el ambiente hospitalario, y desde hace algunos años ha sido preocupante el desarrollo de resistencia ante tratamientos antibióticos, y por tanto la pronta identificación de esta bacteria se hace indispensable, para tal propósito, considerando las características de ELISA-Polimixina se plantea la siguiente pregunta: ¿sería posible utilizar el método ELISA-Polimixina para identificar a *Klebsiella pneumoniae*, basándose en que es un método utilizado en la identificación de algunas bacterias Gram-negativas en muestras de origen cárnico?.

4. OBJETIVOS

- I. Obtener IgM específica contra lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae* a través de la inmunización de un conejo blanco Nueva Zelanda.
- II. Obtener el conjugado IgM-peroxidasa de rábano, específico para lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae*, que será utilizado en ELISA-Polimixina para la identificación de esta bacteria.
- III. Identificar a *Klebsiella pneumoniae* en muestras clínicas utilizando el sistema VITEK 2.
- IV. Evaluar la correlación entre los resultados obtenidos utilizando el sistema VITEK con el método ELISA-Polimixina.

5. HIPÓTESIS

Considerando que la prueba ELISA-Polimixina es capaz de identificar bacterias Gram-negativas por la presencia de lipopolisacáridos específicos de cada especie, podemos suponer que este método puede utilizarse para identificar a *Klebsiella pneumoniae*, y que los resultados obtenidos por este método correlacionarán con los del sistema VITEK de modo tal que ELISA-Polimixina podría utilizarse de manera confiable en la identificación de *K. pneumoniae* en muestras clínicas.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Material

Material biológico

Cepa de *Klebsiella pneumoniae*

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de muestras biológicas

Conejo Blanco Nueva Zelanda (NZW)

Equipo

Balanza analítica Ohaus

Balanza granataria Ohaus

Centrífuga Hamilton Bell VanGuard V6500

Espectrofotómetro Jenway 6305 UV/Vis.

Espectrofotómetro Spectronic 20+, Thermo Scientific

Incubadora Shel Lab.

Lámpara UV marca UVP Inc.

Olla de presión Presto 21 L

Recolector de fracciones 212 Redirac

Refrigerador Whirpool

Rocker platform Bell Glass Inc.

Vortex Scientific Industries Inc.

Material de vidrio

Matraz Erlenmeyer de 1000 mL, 500 mL, 250 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL marca Kimax y

Pirex

Matraz volumétrico de 1000 mL y 50 mL marca Kimax

Pipetas graduadas de 10 mL, 5 mL, 2 mL, 1 mL, 0.1 mL marca Kimax

Pipetas Pasteur

Portaobjetos

Probetas de 1000 mL, 500 mL, 100 mL, 25 mL marca Kimax

Tubos de ensayo 13X100 y 18X150 marca Pirex y Kimax

Vasos de precipitado de 500 mL, 250 mL, 100 mL, 50 mL marca Pirex

Medios de cultivo

Agar Soya tripticaseína Bioxon

Agar MacConkey Bioxon

Reactivos

Ácido cítrico J.T. Baker

Ácido sulfúrico J. T. Baker

Agua destilada

Alcohol etílico J.T. Baker

Azul Brillante R Sigma

Bicarbonato de sodio Hycel de México

Carbonato de sodio Hycel de México

Cloruro de potasio Técnica química S.A.

Cloruro de sodio Hycel de México

Colato de sodio Sigma-Aldrich

Cristal Violeta Sigma Chemical Co.

Dextrosa anhidra Merck

Fenol Hycel de México

Formaldehído al 37% J.T. Baker

Fosfato de potasio monobásico Hycel de México

Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado J.T. Baker

Glicerol Sigma-Aldrich

Glutaraldehído Sigma-Aldrich

Hidróxido de sodio J.T. Baker

L-Lisina Hycel de México

Lugol Hycel de México

Ortofenilendiamina Sigma de México S.A. de C.V.

Peroxidasa de rábano Sigma de México S.A. de C.V.

Peróxido de hidrógeno 30 v/v Sigma de México S.A. de C.V.

Safranina Sigma de México S.A. de C.V.

Solución salina 0,85% Delmed

Sulfato de polimixina Laboratorios Sophia S.A. de C.V.

Timerosal Sigma de México

Tween 20 Técnica química S.A.

Otros

Asa bacteriológica

Cajas de Petri estériles de plástico de 100X15 mm SYM laboratorios

Calculadora Casio modelo fx-350MS

Columna de 1X50 cm Dialysis tubing Sigma

Gasas

Gradilla

Mechero de Bunsen

Mechero Fisher

Membrana de celulosa de 21X33 mm 1200 Daltons

Parafilm M 4 pulgadas

Película antiadherente Kleen pack

Pinzas tres dedos con nuez

Pipetas semiautomáticas de 5 a 40 μ L Finnpiquette, 40 a 200 μ L Labsystem y 100 a 1000 μ L Poline

Sephadex G 200

Solución de hipoclorito

Soporte Universal

Tela de asbesto

6.2 Métodos

Cultivo bacteriano

1. Preparar 200 mL de agar soya tripticaseína: Pesar 8g de soya tripticaseína (marca BIOXON) y disolver en 200 mL de agua destilada, y esterilizar a 121° C/15 lb/in³ durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta una temperatura de 45° C y verter cerca del mechero en cajas Petri y cuatro botellas de cultivo de tejido de 250 mL Nunclon Nuc, colocándolas en forma horizontal y esperar a que solidifiquen.
2. Sembrar los microorganismos masivamente en placas de Petri con agar soya tripticaseína e incubar a 37° C en condiciones aeróbicas durante 24 a 48 horas.
3. A cada caja de Petri sembrada con el cultivo, se agregan 5 mL de solución salina isotónica estéril, resuspendiendo los microorganismos y recolectando en un tubo estéril los 5 mL
4. En cada botella de 250 mL Nunclon Nuc, verter 1 mL de la suspensión del paso cuatro, en condiciones asépticas, cuidando que se distribuya en toda la botella e incubar a 37° C, por 48 horas o hasta obtener una capa gruesa de microorganismos.

Metodología de VITEK 2

1. A partir de una colonia aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 3 mL de solución salina 0,45% en un tubo de 12X75 mm de modo que la lectura en el turbidímetro sea 0,5-0,63.
2. Colocar el tubo en el casete y luego colocar la tarjeta de identificación para Gram-negativas VITEK en el casete, introduciendo el tubo de la tarjeta dentro del tubo de la muestra.
3. Colocar el casete en la puerta superior y oprimir el botón de llenado, es necesario esperar a que el aparato indique que el proceso de llenado se ha completado.

4. Después el casete se coloca en la puerta inferior y automáticamente el aparato separará la tarjeta y la llevará al carrusel donde se realizarán las lecturas.
5. Esperar a que el aparato reporte los resultados indicando de que microorganismo se trata.

Preparación del antígeno bacteriano

1. Colocar 20 mL de la solución salina estéril al 0,85% en las botellas de cultivo de tejido y agitar hasta retirar la capa de bacterias del agar.
2. Realizar otra vez el mismo procedimiento del paso uno, pero con 10 mL de solución salina estéril al 0,85% y repetir hasta que el agar se vea transparente o sin indicios de capa de bacterias.
3. Vaciar el líquido de los lavados en una botella de centrifugación de 250 mL marca Nalgene que se calibrará con otra para ser centrifugada a 6000rpm por una hora.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en 100 mL de solución salina estéril 0,85%, así hasta completar cinco lavados.
5. Resuspender el botón con 1 mL de solución salina 0,85%
6. Preparar los tubos de la escala de Mc Farland
7. En un tubo colocar 3 mL de solución salina 0,85% y agregar gota a gota la suspensión de bacterias hasta igualar el tubo 1 de la escala de Mc Farland.
8. Poner el tubo a ebullición durante dos horas, dejar enfriar y refrigerar a 4° C
9. Esta solución es necesaria para la inmunización.

Generación en conejo del suero anti LPS y purificación de IgM

Esquema de inmunización

Inmunizar un conejo raza Nueva Zelanda Blanco con un peso aproximado de 2,800 g por vía intravenosa utilizando el antígeno O igualado al tubo 1 de la escala de McFarland. El esquema de inmunización será el siguiente:

Día 0, inyectar 0.25 mL

Día 3, inyectar 0.25 mL

Día 7, inyectar 0.3 mL

Día 10, inyectar 0.3 mL

Día 16, Sangrar por punción cardíaca

La sangre recolectada se deja coagular y se separa el suero por centrifugación.

Purificación de IgM

1. Llenar una columna con Sephadex G 200, permitir que sedimente hasta formar una columna compacta.
2. Determinar el volumen vacío con dextrana azul al 1.0%
3. Pasar el suero de conejo anti LPS (que contiene la IgM) a la columna y eluir con solución amortiguadora de fosfatos a 0.1M a pH 6,8 (PBS)
4. Después de que sale el volumen vacío obtenga en el colector de fracciones muestras de 3 mL en tubos de ensayo.
5. Realizar la lectura de las fracciones a 280 nm
6. La fracción donde se encuentre el primer pico de lectura del espectrofotómetro a 280 nm es la que contiene IgM, α - 2 macroglobulina y algunas lipoproteínas, los complejos de hemoglobina-haptoglobina a veces están presentes y son detectables fácilmente por un color rojizo.

7. Cuantificar la fracción y ajustar a 5 mg/mL de anticuerpo con solución salina estéril; si la concentración es menor proceder a concentrar en tubos de amicon.

Elaboración del conjugado

Realización del acoplamiento del conjugado

1. Disolver 10 mg de peroxidasa de rábano picante en 0,2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0,1M a un pH de 6,8 que contiene 1,25% de glutaraldehído, dejarlo reposar 18 horas a temperatura ambiente.
2. Se elimina el glutaraldehído en cromatografía con Sephadex G25 o por diálisis con solución salina 0,85%
3. Concentrar a 1 mL usando tubos amicon de Milipore y adicionar un mL de IgM a 5 mg/mL en solución salina y 0,1 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio-carbonato de sodio 1M a un pH de 9,5.
4. Se procede a agitar suavemente y se deja a temperatura de 4° C durante 24 horas. Adicionar 0,1 mL de lisina al 0,2M en PBS.
5. Dejarlo a temperatura ambiente por dos horas y dializarlo contra PBS a 4° C. El conjugado se separa de la peroxidasa libre por diálisis contra agua destilada. Se procede a centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos, el conjugado precipita y se elimina el sobrenadante, el precipitado se resuspende en 1 mL de PBS adicionando timerosal o formalina hasta una concentración de 0,01% como conservador.

Preparación del LPS puro

1. Preparación del inóculo. Preparar 10 cajas de Petri estériles con 20 mL cada una de agar infusión cerebro-corazón; sembrar masivamente la bacteria e incubar a 37° C durante 24 horas.
2. Cosechar las colonias con 3 mL de PBS para cada caja y recolectarlo.
3. Preparar 500 mL de agar soya tripticaseína y vaciar 50 mL del medio en 10 botellas de Roux, colocándolas en forma horizontal y esperar a que solidifiquen.
4. Vaciar 3 mL del inóculo en cada botella de Roux y distribuirlo en toda la superficie del medio e incubar a 37° C durante 24 horas.
5. Remover la masa bacteriana con 5 mL de PBS adicionada a cada botella de Roux
6. Reunir las suspensiones bacterianas en tubos de ensayo estériles.
7. Para eliminar el medio de cultivo realizar dos lavados con 7 mL de PBS, en cada lavado centrifugar a 6500 rpm durante 45 minutos, para obtener la biomasa.
8. Someter a esterilización para retirar la cápsula. Tras esto realizar una vez más 2 lavados con PBS.
9. Agregar a la biomasa 50 mL de la mezcla fenol-agua (9:1), agitar y dejar en refrigeración durante 24 horas.
10. Agitar el matraz e introducirlo en baño de agua a 70° C durante 90 minutos.
11. Dejar enfriar y pasar a una botella de centrifugación de 250 mL marca Nalgene, centrifugar a 6000 rpm durante 30 minutos. Separar la fase acuosa y reextraer la biomasa de la interfase y la fase fenólica con 3 mL de PBS en el baño de agua a 70° C durante 60 minutos.
12. Repetir el proceso desde el paso 8 para reextraer el LPS de la biomasa.
13. Reunir los extractos acuosos y dializarlos usando una membrana de diálisis de 12 000 Daltons de exclusión contra PBS, hasta eliminar el fenol.
14. Cuantificar azúcares reductores en los LPS obtenidos mediante el método fenol ácido sulfúrico.

Realización de la técnica de ELISA

1. Se disuelven 50 µg/mL de sulfato de polimixina B para el pegado de la polimixina en solución amortiguadora de fosfatos 0,01M con 0,85% de cloruro de sodio y se colocan 100 µL en cada pozo de una placa de ELISA de alta adherencia Costar, se deja a 37° C durante 30 minutos, se lavan los pozos con PBS-tween al 0,005% 4 veces; se colocan 100 µL de la muestra biológica tratada* en cada pozo. Se incuba a 37° C durante 30 minutos, se lava 4 veces y se adiciona el conjugado previamente titulado, se incuba a 37° C durante 30 minutos y se le adiciona 100 µL de sustrato con cromógeno se incuba 30 minutos y se leen las placas en un lector de ELISA Awareness Technology INC, a 450 nm.
2. Se colocan muestras negativas y con la siguiente fórmula se calcula el corte:
Corte= media de los valores negativos + 2 desviaciones estándar de la media.
De tal manera que todo valor que esté por arriba será considerado positivo y lo que sea igual o menor al valor e corte será negativo. Aquellas muestras positivas que estén cercanas al valor de corte se repetirán.

* Tratamiento de la muestra: agregar 100 µL de la muestra más 125 µL de PBS y otros 25 µL de colato de sodio al 5%, se calientan durante 12 minutos a ebullición, posteriormente se enfría y se centrifuga a 3500 rpm por 5 minutos y se toman 100 µL para realizar el ELISA.

Cuantificación de LPS por el método de fenol- ácido sulfúrico

1. Realizar una curva patrón empleando el método de fenol-ácido sulfúrico para azúcares reductores.
2. Pesar 0,01 g de dextrosa anhidra, llevar a 100 mL con agua destilada en un matraz aforado. Esta es la solución estándar con una concentración final de 0,1 mg/mL.
3. Realizar una curva patrón con una serie de 10 tubos más un blanco. Como se indica en el cuadro a continuación:

Cuadro 6.2.1 Elaboración de la curva patrón

Número de título	Estándar de dextrosa(mL)	Agua destilada(mL)	Fenol al 80% (mL)	Á. sulfúrico concentrado (mL)
Blanco	0,0	1,0	0,1	5,0
1	0,1	0,9	0,1	5,0
2	0,2	0,8	0,1	5,0
3	0,3	0,7	0,1	5,0
4	0,4	0,6	0,1	5,0
5	0,5	0,5	0,1	5,0
6	0,6	0,4	0,1	5,0
7	0,7	0,3	0,1	5,0
8	0,8	0,2	0,1	5,0
9	0,9	0,1	0,1	5,0
10	1,0	0,0	0,1	5,0

Reposar de 20 a 30 minutos y leer a 490 nm

Realizar diluciones 1:10; 1:50; y 1:100 del LPS purificado en agua destilada

Preparación de las diluciones

- a) Dilución 1:10. Tomar 0,5 mL de LPS + 4,5 mL de agua destilada (A)
- b) Dilución 1:50. Tomar de A 1 mL + 4 mL de agua destilada (B)
- c) Dilución 1:100. Tomar de B 2 mL + 2 mL de agua destilada

Tomar 2 mL de cada dilución y proceder como se muestra en el cuadro siguiente:

Cuadro 6.2.2 Tratamiento para las muestra de LPS

Dilución	mL de la dilución	Fenol al 80% (mL)	Ácido sulfúrico concentrado (mL)
1:10	2 mL	0,1	5,0
1:50	2 mL	0,1	5,0

Titulación de anticuerpo por aglutinación activa

1. Se agrega una pizca de azul brillante a una suspensión bacteriana, la cual previamente fue sometida a lavados y esterilización para remover la cápsula; además la masa bacteriana se resuspendió ajustándose al tubo número 3 de la escala de MacFarland que corresponde a $9,0 \times 10^8$ bacterias por mililitro.
2. Se coloca una gota de antígeno en cada sitio de la placa de prueba.
3. Se adiciona el volumen establecido de suero de conejo inmunizado a cada uno de los sitios de prueba de la placa.
4. Cada mezcla se agita con un aplicador, y después la placa se mueve suavemente para mezclar.
5. Observar cada sitio de prueba y verificar si existe aglutinación.

7. RESULTADOS

Se obtuvo una disolución de lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae* para administrarlo al conejo blanco Nueva Zelanda siguiendo el esquema de inmunización, con ello, y tras la extracción de sangre del conejo, se obtuvo el antisuero necesario para el proyecto. Este suero fue separado utilizando la técnica de filtración en gel con una columna de Sephadex G 200 y utilizando PBS como eluyente. Tras la separación de las fracciones del suero de conejo inmunizado, se tomaron lecturas de absorbancia a 280 nm (*Cuadro 7.1*) con el objetivo de determinar que fracción sería la más adecuada para los procesos siguientes; se observó un primer valor alto de absorbancia en la fracción 2, es decir que esta fracción contiene la mayor cantidad de IgM; para corroborar el uso de la fracción 2, se reto a cada fracción del antisuero contra el antígeno, realizando una prueba de aglutinación activa (*Cuadro 7.2*), donde la fracción 2 presentó un título de aglutinación de 800, por lo que se eligió como la fracción más favorable para el proceso de pegado de la peroxidasa de rábano.

Por otro lado, se realizó la titulación del lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae* por el método fenol-sulfúrico, observándose que la solución de LPS tiene un valor de 6,6 µg/mL, valor conocido gracias a la interpolación del valor de absorbancia de la muestra en la curva patrón de glucosa (*Cuadro 7.3*), este valor resulta útil para la determinación de la concentración óptima para el ELISA-Polimixina.

El proceso continuó con el pegado de la peroxidasa de rábano, en la fracción de antisuero seleccionada, utilizando glutaraldehido; obteniéndose así el conjugado de IgM anti-LPS de *Klebsiella pneumoniae*; con el cual se realizó la curva de titulación a partir de los datos mostrados en el *Cuadro 7.4.1*; para construir la representación gráfica (*Cuadro 7.4.2*) se utilizó el logaritmo de la concentración del conjugado contra absorbancia, con el objetivo de conocer la concentración adecuada de conjugado para realizar ELISA-Polimixina, determinándose la concentración 1:50 como la mejor, pues exhibe las lecturas de absorbancia más altas con una concentración baja.

Con respecto a las muestras clínicas, éstas fueron identificadas por el sistema VITEK, cuyas suspensiones bacterianas requeridas para llenar las tarjetas de identificación de Gram negativos en el sistema VITEK fueron preparadas a partir de colonias aisladas en

medios diferenciales, principalmente, agar McConkey; todas las muestras obtuvieron un porcentaje de probabilidad de al menos 89%, siendo así confiablemente identificadas para su posterior análisis en el ELISA-Polimixina.

Tras la identificación de las especies bacterianas, y previo a ELISA-Polimixina, se realizó el tratamiento, a cada una de ellas, con colato de sodio, que es un detergente iónico que es especialmente útil en la preparación de liposomas, aislamiento de lípidos y lisis celular. Una vez conocida la concentración adecuada de conjugado y teniendo listas las muestras de origen clínico, se realizó ELISA-Polimixina, para ello se asignó un pocillo de manera aleatoria a cada muestra bacteriana identificada, los resultados del ensayo se muestran en el *Cuadro 7.5*.

A partir de los valores de absorbancia de las muestras negativas se estableció el valor de corte (0.277), sumando dos desviaciones estándar, al valor de media de las absorbancias presentadas por las muestras que no eran *Klebsiella pneumoniae*. Por lo tanto, cualquier muestra que exhibió un valor de absorbancia mayor a 0.277 fue considerada como *Klebsiella pneumoniae* según la técnica ELISA-Polimixina.

Una vez establecida la presencia o ausencia de *Klebsiella pneumoniae* por el sistema VITEK y la positividad o negatividad de las muestras según ELISA-Polimixina, se construyó el *Cuadro 7.6*, y a partir de este cuadro se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Obteniéndose una sensibilidad de 36.5%, especificidad de 100%, además de un valor predictivo positivo de 100% y un valor predictivo negativo 34.4%.

Cuadro 7.1 Absorbancia, a 280 nm, de cada fracción del suero de conejo inmunizado

Fracción	Absorbancia
1	1,527
2	1,687
3	1,382
4	1,887
5	1,654
6	1,218
7	1,326
8	1,142
9	1,117
10	1,147
11	1,959
12	1,244
13	1,939
14	1,824

Cuadro 7.2 Resultados de la aglutinación activa de las fracciones de antisuero

Dilución	Fracciones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1:20	-	-	+++	+++	+++	++	++	-
1:40	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-
1:80	-	+++	+++	+++	++	++	-	-
1:160	-	+++	+++	++	-	-	-	-
1:320	-	-	-	-	-	-	-	-

(+++)=Aglutinación bien definida y abundante; (++)=Aglutinación bien definida; (+)=Aglutinación escasa; (-)=Sin aglutinación
A partir de los datos mostrados en el cuadro 6.2 y considerando las diluciones realizadas se determinó el título de cada fracción.

Cuadro 7.3 Resultados de la curva patrón de glucosa.

Tubo	Concentración Dextrosa [µg]	Absorbancia
1	10,7	0,050
2	21,4	0,135
3	32,1	0,135
4	42,8	0,220
5	53,5	0,220
6	64,2	0,300
7	74,9	0,360
8	85,6	0,350
9	96,3	0,480
10	107	0,500

A partir de los resultados se pudo construir la ecuación: $F(x)=0,0045x + 0,0072$, con una $R^2= 0,9699$.

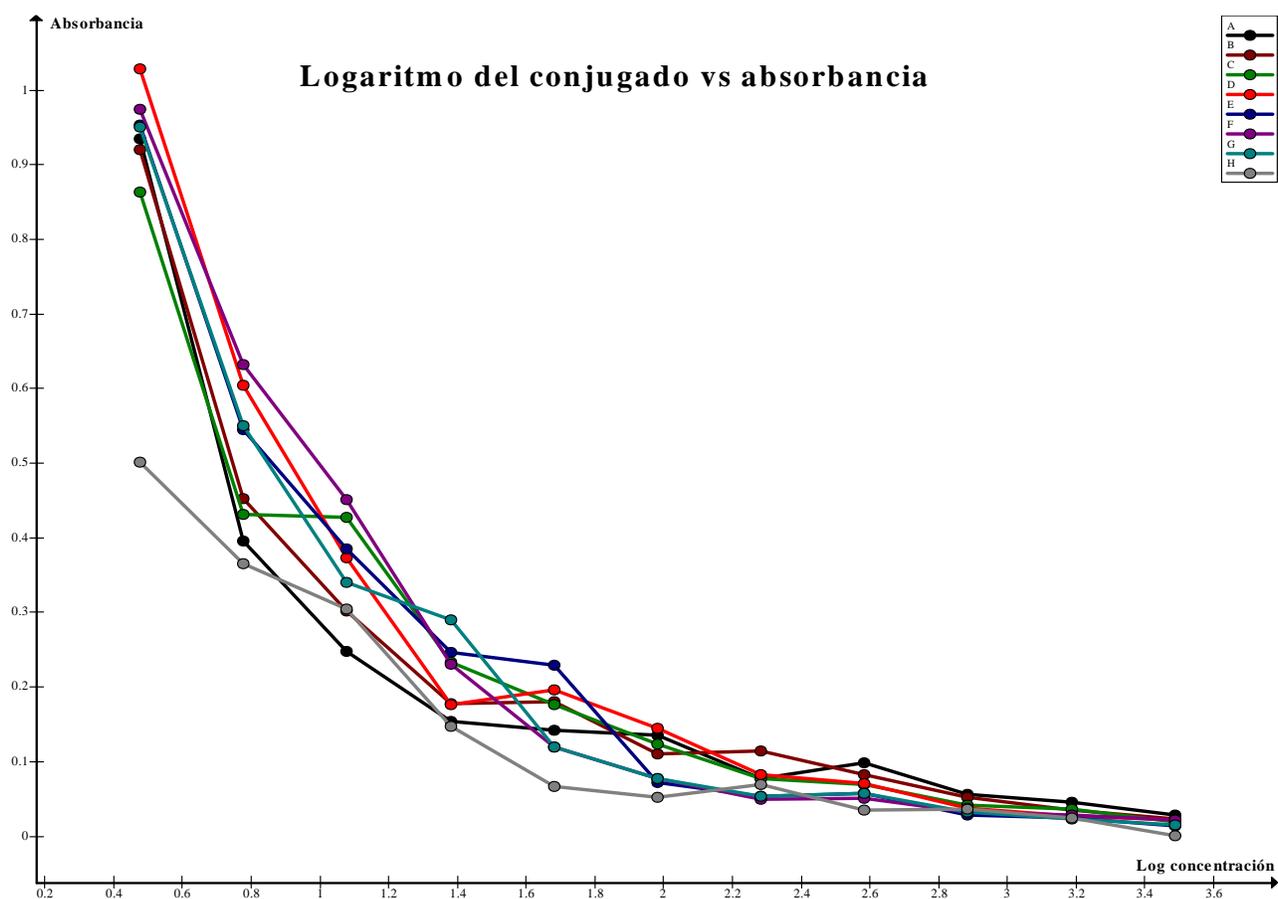
La dilución de lipopolisacárido 1:10 presentó un valor de absorbancia de 0.21, que equivale a 44.5766 µg de LPS, según los cálculos realizados a partir de los datos del *Cuadro 6.3*, utilizando una calculadora *Casio modelo fx-350MS*.

Se multiplicó este valor por el inverso de la dilución para encontrar la concentración de la muestra problema, dando un resultado de 0.4451 mg de LPS.

Cuadro 7.4.1 Resultados de absorbancia de la titulación del conjugado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1A	0.935	0.396	0.248	0.154	0.142	0.136	0.078	0.099	0.056	0.045	0.028	0.009
1B	0.962	0.452	0.302	0.178	0.181	0.111	0.114	0.083	0.052	0.035	0.023	0.005
1C	0.864	0.432	0.428	0.233	0.176	0.124	0.078	0.069	0.042	0.037	0.019	0.002
1D	1.029	0.605	0.373	0.177	0.196	0.145	0.085	0.071	0.038	0.027	0.022	0.006
1E	0.954	0.545	0.385	0.246	0.229	0.072	0.054	0.058	0.028	0.025	0.014	0.003
1F	0.974	0.632	0.451	0.230	0.119	0.077	0.050	0.051	0.033	0.028	0.022	0.001
1G	0.951	0.550	0.340	0.290	0.119	0.077	0.054	0.057	0.033	0.023	0.015	0.002
1H	0.0501	0.366	0.305	0.147	0.067	0.052	0.069	0.035	0.036	0.025	0.001	0.000

Cuadro 7.4.2 Gráficos de logaritmo de la concentración del conjugado contra absorbancia



Cuadro 7.5 Resultados del ensayo de identificación por ELISA-Polimixina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.270	0.361	0.360	0.174	0.113	0.230	0.163	0.113	0.166	0.249	0.159	0.203
B	0.161	0.227	0.227	0.255	0.168	0.264	0.203	0.243	0.471	0.462	0.264	0.626
C	0.128	0.092	0.737	0.383	0.077	0.102	0.111	0.086	0.141	0.111	0.224	0.444
D	0.294	0.239	0.188	0.253	0.206	0.252	0.193	0.302	0.262	0.207	0.138	0.152
E	0.432	0.627	0.089	0.118	0.770	0.146	0.487	0.516	0.201	0.098	0.176	0.132
F	0.468	0.186	0.170	0.624	0.213	0.173	0.140	0.231	0.184	0.164	0.280	0.088
G	0.800	0.170	0.119	0.163	0.122	0.502	0.545	0.079	0.503	0.518	0.099	0.255

Klebsiella pneumoniae

Escherichia coli

Enterococcus faecalis

Pseudomonas aeruginosa

Media de los valores en muestras negativas: **0.185**

Desviación estándar de los valores en muestras negativas: **0.046**

Entonces se considera como positivo el valor aquel que se encuentre dos desviaciones estándar arriba de la media, es decir, que presente un valor de absorbancia mayor a **0.277**

Por lo tanto los datos considerados positivos se ilustran con en color blanco.

Cuadro 7.6 Cuadro 2X2 de los resultados del ensayo para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* por ELISA-Polimixina

	Presente	Ausente	Totales
Positivo	23	0	23
Negativo	40	21	61
Totales	63	21	84

Partiendo de los resultados del *Cuadro 6.6*, se calcularon los siguientes datos:

a) Cálculo de sensibilidad

Sensibilidad = Verdaderos positivos/ (Verdaderos positivos + Falsos negativos)

Sensibilidad = 23/63

Sensibilidad = 36.5%

b) Cálculo de especificidad

Especificidad = Verdaderos negativos/ (Verdaderos negativos + Falsos positivos)

Especificidad = 21/(21)

Especificidad = 100%

c) Cálculo de valor predictivo

Valor predictivo del test positivo = Verdaderos positivos/Total de muestras positivas

Valor predictivo del test positivo = 23/23

Valor predictivo del test positivo = 100%

Valor predictivo del test negativo = Verdaderos negativos/Total de muestras negativas

Valor predictivo del test negativo = 21/61

Valor predictivo del test negativo = 34.4%

8. DISCUSIÓN

Klebsiella pneumoniae es un agente infeccioso intrahospitalario de alta incidencia resistente a diversos antibióticos que es capaz de provocar neumonías y septicemias, principalmente en personas con enfermedades crónicas o en periodo de recuperación; ésta bacteria es identificada tradicionalmente por métodos bioquímicos que pueden tardar varias horas, por lo que un método más rápido como ELISA-Polimixina, sería muy útil en la identificación de este bacilo Gram negativo.

Inicialmente se obtuvo el antisuero de conejo, que al ser evaluado en la prueba de aglutinación, demostró ser efectivo contra *Klebsiella pneumoniae* incluso a concentraciones bajas como se muestra en el *cuadro 6.2*, lo que demuestra que la inmunización en el conejo generó IgM específica contra el LPS de *K. pneumoniae*.

Tras resultar exitosa la inmunización, se elaboró el conjugado IgM-peroxidasa de rábano, el cual fue probado siguiendo la metodología de ELISA-Polimixina utilizando diluciones del antígeno; y basándose tanto en las lecturas de absorbancia expuestas en el *cuadro 6.4.1* como en la gráfica mostrada en el *cuadro 6.4.2*, se demostró que el conjugado se había elaborado de manera correcta, es decir, el conjugado es capaz de unirse a determinantes antigénicos presentes en el LPS de *Klebsiella pneumoniae* y desarrollar color al añadirse el sustrato.

Por otra parte, la identificación de *Klebsiella pneumoniae* por VITEK, no presentó problema alguno, pues VITEK es un sistema de fácil manejo y que ha demostrado una efectividad de 95% en la identificación de bacterias Gram negativas (*Ling et al 2001*). Además de *K. pneumoniae* se identificaron muestras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, mismas que sirvieron como muestras negativas para el ELISA-Polimixina. Sin embargo para obtener los resultados fue necesario aislar a la bacteria, realizar tinción de Gram, cargar la tarjeta de identificación y esperar a que las bacterias fuesen identificadas, lo que en suma es un periodo prolongado de tiempo, y al tratarse de enfermedades del ambiente hospitalario cada hora implica un riesgo mayor para el paciente, por lo que es necesario un método capaz de reducir considerablemente el tiempo de identificación y para ello se propone el sistema ELISA-Polimixina.

Al realizar ELISA-Polimixina para la identificación de *K. pneumoniae*, utilizando a VITEK como método de referencia, se obtuvo una sensibilidad baja (36.5%), lo que significa que este método presenta una baja capacidad para detectar *Klebsiella pneumoniae* evitando la presencia de falsos negativos, esto muy probablemente es a causa de la diversidad de antígenos O que puede presentar esta bacteria, a pesar de que se sabe que el serotipo más común en muestras clínicas es el O1 (*Hansen et al 1998*), es necesario considerar los otros 9 serotipos de *K. pneumoniae*.

También fue calculada la especificidad del método, obteniéndose un valor de 100%, es decir, ELISA-Polimixina para identificar *K. pneumoniae* tiene alta capacidad para descartar muestras ausentes de *K. pneumoniae*, evitando la presencia de falsos positivos, con ello se garantiza que si ELISA-Polimixina identifica a *K. pneumoniae* en una muestra, se tiene la certeza para iniciar el tratamiento inmediatamente, ofreciendo al paciente la oportunidad de un mejor tratamiento y pronóstico.

Además fueron calculados los valores predictivos, que afirman que este método tiene alta capacidad para identificar a *K. pneumoniae* en muestras positivas evitando falsos negativos y una baja capacidad para dar un resultado negativo a las muestras realmente ausentes de *K. pneumoniae*, evitando falsos negativos.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvo IgM específica contra lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae* a través de la inmunización de conejo blanco Nueva Zelanda, administrando el LPS como antígeno.

Se elaboró con éxito el conjugado IgM-peroxidasa de rábano, específico contra lipopolisacárido de *Klebsiella pneumoniae*.

ELISA-Polimixina demostró una reducción importante en el tiempo de identificación de *Klebsiella pneumoniae* en comparación con el sistema VITEK.

El sistema ELISA-Polimixina fue capaz de identificar algunas de las muestras de *Klebsiella pneumoniae* a través de su lipopolisacárido, no obstante, ELISA-Polimixina no garantiza la identificación de *Klebsiella pneumoniae* con la misma certeza que VITEK, debido a la cantidad de falsos negativos que presenta.

ELISA-Polimixina se sugiere como prueba de tamizaje para aquellos pacientes de quienes se sospeche una infección por *Klebsiella pneumoniae*, y en caso de resultar positiva la prueba, se puede iniciar confiablemente el tratamiento, debido a la gran especificidad que presenta ELISA-Polimixina

10. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

Resulta conveniente rediseñar el proyecto en lo que a nivel de identificación se refiere, sería excelente identificar las muestras de *Klebsiella pneumoniae* a nivel de serotipo según el antígeno O para evitar las interferencias por este antígeno y así garantizar la efectividad de ELISA-Polimixina. Además, se propone que ELISA-Polimixina podría ser de gran utilidad en la identificación del resto de bacterias Gram negativas causantes de infecciones nosocomiales y bacteremias.

11. REFERENCIAS

- 1 Izquierdo L. Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae* [tesis doctoral]. Barcelona: Departamento de microbiología, Universidad de Barcelona; 2003
- 2 Seidler R, Knittel M, Brown C. Potential Pathogens in the Environment: Cultural Reactions and Nucleic Acid Studies on *Klebsiella pneumoniae* from Clinical and Environmental Sources. *Appl Microbiol* 1975;29(6):819-25
- 3 Brooks F, Butel J, Morse S. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18ª ed. México: Manual moderno; 2004
- 4 Rojas N, Chaves E, García F. Bacteriología diagnóstica. Costa Rica: Facultad de microbiología; 2006
- 5 Ryan K, Ray G. Sherris Medical Microbiology: An introduction to infectious diseases. 4ª ed. U.S.A.: McGraw-Hill; 2004
- 6 Emori T, Gaynes R. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(4):428-42
- 7 Hansen D, Gottschau A, Kolmos H. Epidemiology of *Klebsiella bacteraemia*: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J Hosp Infect* 1998;38(2):119-32
- 8 Ko W, Paterson D, Sagnimeni A, et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis* 2002;8(2):160-66
- 9 Hervás J, Alomar A, Salvá F, et al. Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca (Spain), 1977-1991. *Clin Infect Dis* 1993;16(5):719-24
- 10 Bryan C, Reynolds K, Brenner E. Analysis of 1,186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev Infect Dis* 1983;5(4):629-38
- 11 Ávila C, Cashat M, Aranda E, León A, Justiniani N, Pérez L, et al. Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños: encuesta de 21 hospitales en México. *Salud Pública Méx* 1999;41(1):18-25
- 12 Chan K, Yu W, Tsai C, Cheng K, Hou C, Lee M, et al. Pyogenic liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae*: analysis of the clinical characteristics and outcomes of 84 patients. *Chin Med J* 2007;120(2):136-39
- 13 Montgomerie J. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev Infect Dis* 1979;1(5):736-53

- 14 Yinnon A, Butnaru A, Raveh D, et al. *Klebsiella bacteraemia*: community versus nosocomial infection. Q J Med 1996;89:933-41
- 15 Sirot D, Sirot J, Labia R, et al. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. J Antimicrob Chemother 1987;20(3):323-34
- 16 Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, et al. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet 1987;2(8554):302-06
- 17 Bermejo J, Lesnaberes P, Arnesi N, et al. Factores de riesgo asociados a infecciones por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ceftacidima. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21(2):72-6
- 18 Yu V, Hansen D, Ko W, et al. Virulence Characteristics of *Klebsiella* and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. Emerg Infect Dis 2007;13(7):986-93
- 19 Sánchez J, Feris-Iglesias J, Fernández J, et al. Aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en recién nacidos en el Hospital Infantil Dr. Robert Reid Cabral de Santo Domingo, República Dominicana. Rev Panam Infectol 2005;7(4):15-20
- 20 Paterson J. Extended spectrum beta-lactamases: a therapeutic dilemma. Ped Infect Dis J 2002;21(10):957-59
- 21 Tenover F, Mohammed M, Gorton T, et al. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. J Clin Microbiol 1999;37(12):4065-70
- 22 Livermore D. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):557-84
- 23 Cortés G, Astorza B, Benedí V, Albertí S. Role of the htrA gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence. Infect Immun 2002;70(9):4772-76
- 24 Álvarez D, Merino S, Tomás J, et al. Capsular polysaccharide is a major component resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. Infect Immun 2000;68(2):953-55
- 25 Tortora J, Funke B. Introducción a la microbiología. 9ª ed. España: Editorial médica panamericana; 2007
- 26 Albertí S, Hernández S, Gil J, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay method for typing and quantitation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide: application to serotype O1. J Clin Microbiol 1993;31(5):1379-81

- 27 Hansen D, Mestre F, Albertí S, et al. *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide O Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution among Clinical Isolates from Different Sources and Countries. J Clin Microbiol 1999;37(1):56-62
- 28 Raetz C, Ulevitch R, Wright S, et al. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J 1991;5(12):2652-60
- 29 Ohno N, Morrison D. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. J Biol Chem 1989;264(8):4434-41
- 30 Jacques M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. Trends Microbiol 1996;4(10):408-10
- 31 Vinogradov E, Cedzynski M, Ziolkowski A, Swierzko A. The structure of the core region of the lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae* O3. 3-deoxy-alpha-D-mannooctulosonic acid (alpha-Kdo) residue in the outer part of the core, a common structural element of *Klebsiella pneumoniae* O1, O2, O3, O4, O5, O8, and O12 lipopolysaccharides. Eur J Biochem 2001;268(6):1722-29
- 32 Weir Donald M. Inmunología. 3ª Ed. México: Manual Moderno; 1999
- 33 Roit. Inmunología fundamentos. 11ª ed. España: Editorial médica panamericana; 2008
- 34 Regueiro J. Inmunología, biología y patología del sistema inmune. 3ª ed. España: Editorial médica panamericana; 2003
- 35 Devaux G. Técnicas de Bioquímica Clínica. Barcelona: Ed. JIMS;1984
- 36 Valcárcel M, Gómez A. Técnicas Analíticas de Separación. Barcelona: Reverté; 1988.
- 37 Crowther John R. ELISA: teory and practice. EUA: Humana press Inc; 1995
- 38 Kemeny D, Challacombe J. ELISA and other solid phase immunoassays: theoretical and practical aspects. Britain: John Wiley & Sons; 1988
- 39 Schindler P, Teuber M. Action of Polymyxin B on Bacterial Membranes: Morphological Changes in the Cytoplasm and in the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. Antrimicrob Agents Ch 1975;8(1):95-104
- 40 Morrison D, Jacobs D. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. Immunochemistry 1976;13:813-18
- 41 Blais B, Bosley J, Martinez A, Popela M. Polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O111 and O26. J Microbiol Meth 2006;65:468-75
- 42 Blais B, Bosley J, Martinez A. Detection of *Escherichia coli* O157 in food by a novel polymyxin-based ELISA. J Food Prot 2005;68:233-38

- 43 Pincus D. Microbial identification using the bioMérieux vitek® 2 system. EUA:bioMérieux Inc; 2005
- 44 Ling T, Tam P, Liu K, Cheng A. Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39(8):2964-66
- 45 Funke G, Monnet D, Bernardis C, et al. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. *J Clin Microbiol* 1998;36(7):1948-52
- 46 Jordá L, Vila A, Lanza A, et al. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2005;39(1):19-25
- 47 Jossart M, Courcol R. Evaluation of an automated system for identification of Enterobacteriaceae and nonfermenting bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(12):902-07