



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación y caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de una cohorte de recién nacidos de 0 a 24 meses de edad, de Agosto del 2010 a Marzo del 2013, en la comunidad de Xoxocotla, Morelos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BLANCA ESTELA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

ASESORES:

Dr. VÍCTOR RAFAEL CORIA JIMÉNEZ

M. en C. ANDREA BECERRIL OSNAYA



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  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe 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 a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación y caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de una cohorte de recién nacidos de 0 a 24 meses de edad, de agosto del 2010 a marzo del 2013, en la comunidad de Xoxocotla, Morelos

Que presenta la pasante: Blanca Estela González Martínez

Con número de cuenta: 303075743 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Junio de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	QFB. Verónica Ruiz Solorio	
SECRETARIO	QFB. Raquel Tapia Romero	
1er. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
2do. SUPLENTE	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	

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

---

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección del Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez.

---

---

## DEDICATORIAS

A mis papás Rosa Martínez y Ramiro González,  
no tengo palabras para agradecerles todo lo  
que han hecho por mi,  
por todo su amor y paciencia,  
por apoyarme durante estos años,  
sin su esfuerzo no hubiera logrado terminar  
esta etapa de mi vida, los amo y admiro, este  
trabajo también es de ustedes.

A mis hermanas Ana y Auro, pero en especial  
a ti Auro, muchas gracias por todo tu apoyo  
incondicional, por alentarme cuando sentía que  
no podía, eres una gran persona, una gran  
hermana.

A mis amigos, Ischme, Iván, Denisse, Yes,  
Lupe, Óscar gracias por todos los momentos  
que pasamos fue tan divertido y aprendí  
muchas cosas de ustedes, Jael gracias por tu  
ayuda y tu amistad, Paty no se como  
agradecerte todos estos años de amistad,  
gracias por todo tu apoyo, por tu ayuda, eres  
una gran amiga.

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme sus puertas y convertirse en mi segundo hogar.

Al Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez por recibirme en el laboratorio de Bacteriología Experimental por todo su apoyo, enseñanza y por el tiempo que me dedicó durante este proyecto, Dra. Carolina Romo González también le agradezco todo el tiempo que estuvo apoyándome, gracias a usted aprendí muchas cosas.

A mis sinodales: M. en C. Andrea Becerril, Q.F.B Verónica Ruiz, Q.F.B Raquel Tapia, M. en C. Sandra Martínez y Q.F.B Jonathan Paredes, les agradezco todo el tiempo que le dedicaron a la revisión y corrección de esta tesis.

Gracias a Lili, Javier y Armando del Laboratorio de Bacteriología Experimental del INP, por que de ustedes aprendí muchas cosas, por su amistad y ayuda, me llevo maravillosos recuerdos de ustedes son unas excelentes personas, a Yair, Vis e Iván del Laboratorio de Bacteriología por ayudarme con mis dudas y por brindarme su amistad.

---

---

---

## **ÍNDICE**

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
INDICE DE TABLAS.....	VII
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Microbiota intestinal.....	1
1.2.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	3
1.3.- Métodos de genotipificación.....	4
2.- JUSTIFICACIÓN.....	6
3.- OBJETIVO GENERAL.....	7
3.1.- Objetivos particulares.....	7
4.- HIPÓTESIS.....	8
5.- LUGAR DE ESTUDIO.....	9
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
6.1.- Materiales.....	10
6.1.1.- Materiales biológicos.....	10
6.1.2.- Material.....	10
6.1.3.- Equipo.....	10
6.1.4.- Reactivos.....	10
6.2.- Métodos.....	12
6.2.1.-Criterios de inclusión.....	12

---

---

6.2.2.- Criterios de exclusión .....	12
6.2.3.-Antecedentes. Obtención de las cepas bacterianas .....	12
6.2.4.-Identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> mediante Enterotest .....	13
6.2.5.- Obtención de DNA bacteriano .....	14
6.2.6.- Caracterización de <i>Klebsiella pneumoniae</i> mediante RAPD-PCR.....	15
6.2.7.- Prueba de sensibilidad a antibióticos .....	17
7.- DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL .....	18
8.- RESULTADOS .....	20
9.- DISCUSIÓN .....	43
10.- CONCLUSIONES .....	47
11.- REFERENCIAS .....	48
12.- ANEXOS .....	52

---

## **ABREVIATURAS**

***RAPD-PCR*** Amplificación al azar de DNA polimórfico

***PCR*** Reacción en cadena de la polimerasa

***PFGE*** Electroforesis en gel de campo pulsado

***AFLP*** Polimorfismo de longitud de onda de fragmentos  
amplificados

***PCR-RFLP*** Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

***DNA*** Ácido desoxirribonucleico

***PAST*** Paleontological statistics software

***PBS*** Regulador de Fosfatos Salino

---

---

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1. Diagrama de flujo para la identificación de las cepas como <i>K. pneumoniae</i> a partir de las muestras de heces .....	18
FIGURA 2. Diagrama de flujo para la reidentificación de <i>K. pneumoniae</i> utilizando el sistema Enterotest .....	19
FIGURA 3. Patrones de amplificación por RAPD-PCR de cepas de <i>K. pneumoniae</i> aisladas de la cohorte de recién nacidos en Xoxocotla,Morelos...	21
FIGURA 4. Dendrograma general de las 64 cepas de <i>K. pneumoniae</i> estudiadas.....	22
FIGURA 5. Interpretación de los dendrogramas .....	23
FIGURA 6. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 1 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	25
FIGURA 7. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 2 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	26
FIGURA 8. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 3 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	27
FIGURA 9. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 4 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	28

---

---

FIGURA 10. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 5 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos.....	29
FIGURA 11. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 6 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	30
FIGURA 12. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 7 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	31
FIGURA 13. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 8 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	32
FIGURA 14. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 9 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	33
FIGURA 15. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 10 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	34
FIGURA 16. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 11 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	35
FIGURA 17. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No.12 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	36

---

FIGURA 18. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No.13 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	37
FIGURA 19. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 14 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	38
FIGURA 20. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 15 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	39
FIGURA 21. Caracterización de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> de la pareja madre-hijo No. 16 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	40
FIGURA 22. Interpretación de los resultados de EnteroPluri Test .....	52
FIGURA 23. Tabla de códigos para la identificación por EnteroPluri Test .....	53
FIGURA 24. Base de datos para la construcción de dendrogramas .....	54
FIGURA 25. Obtención del Dendrograma .....	55

---

---

## **INDICE DE TABLAS**

TABLA 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>K. pneumoniae</i> .....	3
TABLA 2. Valor ID .....	24
TABLA 3. Prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	24
TABLA 4. Patrones de colonización por <i>K. pneumoniae</i> en la cohorte de recién nacidos de Xoxocotla, Morelos .....	41
TABLA 5. Porcentajes de Resistencia a los antibióticos de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> estudiadas .....	42

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota intestinal juega un papel importante en la salud humana proporcionando una barrera para la colonización de patógenos <sup>(1)</sup>.

El tracto gastrointestinal contiene un número muy grande y complejo de población de microorganismos. Se calcula que hay por lo menos 400 especies diferentes de bacterias en la comunidad microbiana del intestino <sup>(2)</sup>.

El estómago y el intestino delgado contienen pocas especies de bacterias adheridas al epitelio y algunas otras bacterias en tránsito. La escasez de bacterias en el tracto superior parece ser debida a la composición del medio luminal (ácido, bilis, secreción pancreática), que mata a los organismos ingeridos y debido a la actividad motora propulsora fásica hacia el final del íleon lo que impide la colonización estable de bacterias en el lumen. En contraste el intestino grueso contiene un ecosistema microbial complejo y dinámico con altas densidades de bacterias vivas que alcanzan concentraciones de hasta  $10^{11}$  o  $10^{12}$  células/ g de contenido luminal <sup>(3)</sup>.

El tracto gastrointestinal de un feto es estéril. Durante el proceso de nacimiento la microbiota de la madre y del entorno circundante coloniza el tracto gastrointestinal del niño hasta que se desarrolla una microbiota densa y compleja. La colonización describe una población bacteriana en el tracto gastrointestinal la cual es estable en tamaño, en el tiempo, y sin la necesidad de reintroducción periódica de bacterias por dosis orales repetidas u otros medios, esto implica que las bacterias colonizadoras se multiplican en un nicho intestinal particular, a una tasa que es igual o superior a su tasa de eliminación en ese sitio <sup>(4)</sup>.

---

La colonización inicial del intestino infantil durante los primeros días de vida se origina principalmente de la mamá y el medio ambiente. Actualmente se considera que en los primeros años de vida una de las primeras determinantes principales de la microbiota intestinal es el modo de parto (1).

La gran mayoría de los autores consideran que en el parto natural los niños son colonizados primero por las bacterias fecales y vaginales de la madre, predominando *E. coli*, *Bacteroides spp* y Bifidobacterias (1,2).

En los niños que nacen por cesárea la colonización anaeróbica es generalmente retrasada y pronto la microflora es compuesta por bacterias microaerofílicas, anaerobios facultativos y bacterias esporuladas tales como *Clostridium sp* originados del medio ambiente hospitalario (5).

Actualmente el efecto de la dieta en la composición de la microbiota de tracto gastrointestinal del infante es controversial (6).

La flora fecal de los niños alimentados exclusivamente con leche materna difiere de los niños alimentados con leche de fórmula o leche de vaca. La flora fecal de los niños alimentados con leche materna es más probable que sea dominada por Bifidobacterias con un bajo número de Enterobacterias y *Streptococcus sp*. En estos niños los Bacteroides y *Clostridium sp* disminuyen a un número bajo durante la primera semana de vida (5).

La flora intestinal de los niños alimentados por fórmula es mucho más compleja en comparación a de los niños alimentados con leche materna. La fórmula también permite alcanzar altas densidades de población de Bifidobacterias. En el final del segundo año la composición y metabolismo de la microflora de los niños se asemeja cercanamente a la de los adultos y es más estable (5).

---

---

## 1.2 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo Gram negativo Oxidasa (-) Catalasa (+) perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un microorganismo capsulado, por lo cual produce colonias húmedas de gran tamaño, de aspecto mucoide (7).

Su identificación se da por las siguientes pruebas bioquímicas:

**TABLA 1: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* (8)**

	KLIGLER	H <sub>2</sub> S	MR	VP	IND	CIT	URE	MOV	MAL	LIS	ORN	ARG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>Klebsiella Oxytoca</i>	A/A	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-

En humanos *K. pneumoniae* es un saprofito común de la nasofaringe y del tracto intestinal. Es responsable de una amplia gama de infecciones nosocomiales, incluyendo neumonía, bacteriemia e infecciones de tracto urinario (9).

El tracto gastrointestinal es considerado el principal reservorio donde la bacteria se propaga en el ambiente hospitalario, el equipo contaminado y el contacto persona a persona son las rutas principales de transmisión (10).

Los factores de virulencia de las cepas de *K. pneumoniae* incluyen el serotipo capsular, el lipopolisacárido, los sistemas de captación de hierro y las adhesinas fimbriales y no fimbriales. La cápsula protege a *K. pneumoniae* contra la acción bactericida del suero, inhibe la fagocitosis y puede ser considerado como el determinante de virulencia más importante de *K. pneumoniae* (11).

Dentro de los factores de virulencia para la colonización gastrointestinal, se encuentran las adhesinas de superficie bacteriana como CF29K, un factor

---

adhesivo no fimbrial codificado por la TEM-5 betalactamasa de espectro extendido (9).

El fenotipo de hipermucoviscosidad observado con la mayoría de las cepas se asocia frecuentemente con la expresión del gen *magA* que codifica el serotipo K1 cps polimerasa. En adición el fenotipo mucoide coexiste con la producción de un sideróforo (9).

*K. pneumoniae* puede albergar, betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas y es capaz de hidrolizar nuevos fármacos con carbapenem. La bacteria es resistente a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim sulfametoxazol (12).

### 1.3 MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN

Se han desarrollado varios métodos de identificación y caracterización de DNA basados en patrones de huellas dactilares, tales como:

\*Amplificación por *PCR* de DNA polimórfico en condiciones de baja especificidad (*RAPD-PCR* por sus siglas en inglés): es producido por la amplificación de segmentos de DNA genómico a través de una reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) usando iniciadores de secuencia arbitraria. Este método es rápido, relativamente barato y ya se ha utilizado con éxito para describir varias especies microbianas incluyendo *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus*, *Proteus mirabilis*, *Legionella pneumophila* y *Borrelia burgdorferi* y *Pseudomonas aeruginosa* (13, Coria y col.).

\**PFGE* (Electroforesis en gel de campo pulsado): Esta técnica se basa en la separación de moléculas de DNA de gran tamaño, en función de la mayor o menor dificultad que presentan para moverse a través de los poros de un gel de agarosa cuando se les somete a un campo eléctrico pulsante (variable en dirección e intensidad), de tal manera que la velocidad de los mismos será

---

---

directamente proporcional a su tamaño. Las variables que intervienen en esta técnica son: el voltaje del campo eléctrico, la concentración del gel de agarosa, la alternancia en el sentido del campo eléctrico y el tiempo de los pulsos, la fuerza iónica del amortiguador y la temperatura de desarrollo. Dependiendo de las condiciones elegidas se favorecerá la separación de las moléculas de distintos tamaños <sup>(14)</sup>.

\* *AFLP* (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados): Este es uno de los primeros métodos desarrollados para la detección de polimorfismos. Se basa en la detección de aquellas variaciones de la secuencia de DNA (codificante o no) que tienen como consecuencia un cambio en la secuencia blanco de restricción. Casi siempre la variación afecta a un solo nucleótido, por lo tanto los fragmentos de restricción que se obtienen son diferentes dependiendo del alelo que esté presente en la muestra. Cada muestra de DNA generará fragmentos múltiples, de longitud diferente en función de los sitios de restricción presentes. Puesto que ellos no corresponden a la región que se pretende estudiar, generalmente se utiliza una sonda que hibrida en posición cercana al sitio polimórfico y se analizan los fragmentos por el método de Southern <sup>(15)</sup>.

\**PCR-RFLP* (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción): Es una de las primeras técnicas descritas desde la aparición de la PCR, y consiste en visualizar las diferencias a nivel de la estructura del DNA, basándose en el uso de enzimas de restricción que cortan el DNA en sitios donde se encuentra una secuencia específica de nucleótidos. La identificación de los fragmentos (*FRLPs*) requiere del uso de geles de electroforesis que permitan separar los fragmentos de diferente tamaño. La limitación de esta técnica es que únicamente identifica dos alelos por locus, por lo que la variabilidad obtenida es reducida <sup>(16)</sup>.

---

## 2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad hay un número reducido de estudios longitudinales que analicen las relaciones las relaciones entre la flora microbiana de la madre y de los hijos.

Este proyecto estudia a una cohorte de niños aparentemente sanos, pertenecientes a un grupo social desfavorecido, y espera aportar evidencias que ayuden a entender, por medio de una identificación y caracterización genotípica, los mecanismos de colonización y persistencia la adaptación bacteriana en el tracto gastrointestinal.

Utilizamos la colonización de *Klebsiella pneumoniae* como un indicador el cual nos permita analizar la colonización por Enterobacterias en una cohorte de individuos de edad pediátrica.

---

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar a cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de una cohorte de recién nacidos de 0 a 24 meses de edad.

#### **a. OBJETIVOS PARTICULARES**

- i) Identificar cepas de *Klebsiella pneumoniae* a partir de una colección bacteriana obtenida de muestras de heces de una cohorte de recién nacidos durante los primeros 24 meses de vida.
- ii) Caracterizar fenotípicamente a los aislados de *Klebsiella pneumoniae* mediante sus perfiles de resistencia a los antibióticos.
- iii) Caracterizar genotípicamente a los aislados de *Klebsiella pneumoniae* mediante sus perfiles de amplificación por RAPD-PCR.

---

#### 4. HIPÓTESIS

“Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* que colonizan a los recién nacidos de 0 a 24 meses de edad, cambian debido a las presiones selectivas ejercidas por el huésped y el ambiente.”

---

## 5. LUGAR DE ESTUDIO

El proyecto se desarrolló en la localidad de **Xoxocotla**, que está situada en el Municipio de Puente de Ixtla (en el Estado de Morelos). Tiene 19644 habitantes. **Xoxocotla** está a 1030 metros de altitud. En la localidad hay 9768 hombres y 9876 mujeres.

La relación mujeres/hombres es de 1.011. El índice de fecundidad de la población femenina es de 2.64 hijos por mujer. En **Xoxocotla** el 10% de los adultos habla alguna lengua indígena.



---

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Materiales**

#### **6.1.1 Material biológico**

- Cepas de *Klebsiella pneumoniae*

#### **6.1.2 Material**

- Guantes de nitrilo
- Micropipetas 2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL
- Puntas para micropipeta estériles
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos para PCR
- Cajas Petri
- Hisopos
- Vernier
- Nefelómetro de McFarland (0.5)
- Sistema Enterotest

#### **6.1.3 Equipo**

- Vórtex
- Vacufuge
- Centrífuga
- Nanodrop 2000 Thermo Scientific
- Termociclador ARKTIK Thermo Scientific

#### **6.1.4 Reactivos**

- Agar Mc Conkey
- Agar Tergitol
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Soya Trypticaseína
- Caldo Selenito
- Caldo Tetrionato

- 
- Medio Kligler
  - Medio SIM
  - Medio para descarboxilación de Lisina
  - Medio para descarboxilación de Ornitina
  - Medio para descarboxilación de Arginina
  - Medio MR
  - Medio VP
  - Medio Urea
  - Medio Citratos
  - Caldo BHI
  - Reactivo de Indol
  - Reactivo Earlich
  - Rojo de Metilo
  - KOH 10%
  - $\alpha$ -naftol
  - Agua estéril
  - Lisozima
  - Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico
  - Cloroformo: Alcohol isoamílico
  - Acetato de Sodio 3M
  - Etanol 100%
  - Etanol 70%
  - Iniciador OPERON-18 (CAGCACCCAC)
  - Iniciador ERIC-1R (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC)
  - Iniciador Ready-Go-To-Primer-2 (GTTTCGCTCC)
  - KIT para PCR Fermentas®
  - Agarosa
  - Regulador PBS

- 
- Bromuro de Etidio
  - Multidiscos para Gram Negativos BIO RAD®

## **6.2 Métodos**

### **6.2.1 Criterios de inclusión:**

1. Que se tengan aislados de la madre y del hijo
2. Que se tengan al menos 2 aislados del hijo

**6.2.2 Criterios de exclusión:** Cepas de *K. pneumoniae* que no logran recuperarse de los viales de gelosa especial o bien cepas que al ser reidentificadas no pertenecen a este género y especie.

### **6.2.3 Antecedentes. Obtención de las cepas bacterianas (17)**

1. Las muestras de trabajo fueron colectadas por enfermeras capacitadas, a partir de las proporcionadas por las madres. Se obtuvo solo 1 muestra de cada madre y en el caso de los niños se obtuvieron muestras mensuales desde el mes 1 hasta el mes 24.
2. Las muestras de trabajo se colocaron en tubos Eppendorf estériles en recipientes con hielo y el mismo día se transportaron al laboratorio de Bacteriología Experimental para su procesamiento inmediato.
3. Se realizaron tanto siembras directas como siembras de enriquecimiento para la identificación de enteropatógenos.
4. La muestra (heces) se sembró directamente en agar Mc Conkey y Agar Tergitol.
5. La muestra se sembró en caldo selenito y caldo tetracionato, agregándole a este último unas gotas de yodo, a las 24 horas se realizó una resiembra de estos caldos en agar Mc Conkey y agar Tergitol.

- 
6. Los medios de cultivo se incubaron durante 24 horas a 37°C, después de este tiempo se observó el crecimiento para diferenciar las colonias de los microorganismos presentes en la muestra.
  7. Cada colonia diferente se sembró en medio Kligler para saber si se trataba de un fermentador o no fermentador y en medio SIM para establecer la producción de H<sub>2</sub>S, indol y la movilidad.
  8. La identificación de los distintos géneros y especies bacterianos se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales de acuerdo a las sugerencias de la American Society for Microbiology (17).
  9. Las cepas identificadas como *Klebsiella pneumoniae* se sembraron en gelosa especial y se mantuvieron en refrigeración; posteriormente se llevó a cabo una identificación confirmatoria mediante el empleo del sistema Enterotest.

#### **6.2.4 Identificación de *Klebsiella pneumoniae* mediante Enterotest**

(18).

1. A partir de los viales de gelosa especial mantenidos a 4°C, se inocularon 3mL de caldo BHI y éstos se incubaron a 37°C durante 24 hs.
2. Después de la incubación, se sembraron placas de Petri con Agar Soya Trypticaseina (AST) que se incubaron a 37°C durante 24 hs. Posteriormente, se observaron las placas para comprobar la pureza del cultivo y se inoculó el tubo Enterotest con una colonia aislada en AST.
3. Después de la inoculación se incubó el Enterotest durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente se leyeron los resultados de cada prueba del sistema de acuerdo a las indicaciones del productor.

- 
4. Para obtener el código de la bacteria identificada se marcó el valor de cada prueba positiva y se sumaron los números de cada grupo de pruebas para obtener de cada componente el valor ID <sup>(19)</sup>.
  5. Se comparó el valor ID obtenido, con los reportados en el libro de códigos del sistema para establecer la identidad y asignar un biotipo a las cepas identificadas como *Klebsiella pneumoniae*.

#### **6.2.5 Obtención de DNA bacteriano <sup>(20)</sup>.**

1. Las cepas identificadas como *Klebsiella pneumoniae* se sembraron en AST, se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente la biomasa se recolectó en tubos Eppendorf con 500 µL de agua estéril.
2. La biomasa se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 minutos y posteriormente se decantó el sobrenadante.
3. Se agregaron 3 µL de solución de lisozima, se mezcló en el Vórtex y se incubó en hielo durante 30 minutos.
4. Se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.
5. Se mezcló en el Vórtex hasta que la solución se observó blanca
6. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos
7. Se recuperó la fase acuosa, a la cual se le agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló.
8. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa.
9. Se agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH=5.2 +2 volúmenes de etanol al 100%, las muestras se colocaron a -70°C y se incubaron durante 18 hrs (*overnight*).
10. Las muestras guardadas a -70°C se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante.

11. El DNA se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos.
12. Se dejó secar el tubo colocándolo en la *Vacufuge* durante 20 minutos.
13. Al tubo con DNA seco se le adicionaron de 50-100  $\mu\text{L}$  de agua estéril y se resuspendió con la micropipeta, el tubo se incubó en la estufa a 37°C durante 1 hora
14. El tubo se guardó a 4°C.
15. El DNA se cuantificó con el uso del NANODROP 2000 (Thermo Scientific) a una  $\lambda=260$  nm.

#### 6.2.6 Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* mediante amplificación por RAPD-PCR

1. Para realizar la técnica de RAPD-PCR se utilizaron 3 iniciadores diferentes: OPERON-18<sup>(20)</sup>, ERIC-1R<sup>(21)</sup> y *Ready-To-GoPrimer-2*(RTGP-2)<sup>(21)</sup>.
2. Cada muestra se ajustó a una concentración de 100ng/ $\mu\text{L}$ .
3. En cada tubo para RAPD-PCR se colocaron los siguientes volúmenes:

REACTIVO	VOLUMEN
DNA (50ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{L}$
Buffer	2.5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu\text{L}$
dNTP mix	0.5 $\mu\text{L}$
Iniciador	0.6 $\mu\text{L}$
Taq polimerasa	0.2 $\mu\text{L}$
Agua estéril	18.7 $\mu\text{L}$

NOTA: Los reactivos utilizados fueron marca FERMENTAS®

4. Los tubos con la mezcla se colocaron en el termociclador ARKTIK (Thermo Scientific) a las condiciones de amplificación especificadas.

---

**OPER-18 (CAGCACCCAC):**

2 min-94°C

1 min-37°C    2 ciclos

2 min-72°C

10 seg-94°C

20 seg-40°C    33 ciclos

2 min-72°C

5 min-72°C

**RTGP-2 (GTTTCGCTCC):**

5 min-95°C

1 min-95°C

1 min-30°C    45 ciclos

2 min-72°C

**ERIC-1R (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC):**

2 min-94°C

1 min-94°C

1 min-25°C

4 min-72°C    35 ciclos

1 min-94°C

1 min-25°C

8 min-72°C

5. Para observar la amplificación se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, el gel se reveló con luz UV.

6. De las bandas obtenidas en los geles se obtuvo el valor de Rf, con lo que se calculó su tamaño.
7. Con los valores obtenidos se construyeron dendrogramas con la ayuda del programa PAST (*Paleontological statistics software*).

### 6.2.7 Prueba de sensibilidad a antibióticos (8)

1. Se utilizaron cepas de *Klebsiella pneumoniae* puras y se inocularon en caldo Mueller-Hinton incubándose a 37°C durante 2 horas.
2. El caldo Mueller-Hinton se ajustó a una turbidez semejante a la del tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland.
3. Las muestras se sembraron en Placas de Agar Mueller-Hinton, colocando Multidiscos para Gram Negativos (BIO RAD) con los siguientes antibióticos:
4. Se midieron los halos de inhibición y de acuerdo a estos se clasificó a la cepa en estudio como Sensible, Resistente ó Intermedia en cuanto a su susceptibilidad a cada uno de los antibióticos.

ANTIBIOTICO	CONCENTRACION	ANTIBIOTICO	CONCENTRACION
Amikacina	30 µg	Cloranfenicol	30 µg
Ampicilina	10 µg	Gentamicina	10 µg
Levofloxacina	5 µg	Netilmicina	30 µg
Cefalotina	30 µg	Nitrofurantoína	300 µg
Cefotaxima	30 µg	Cefepime	30 µg
Ceftriaxona	30 µg	Trimetoprim-sulfametoxazol	25 µg

## 7. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL

### METODOLOGÍA:

### Obtención de cepas bacterianas

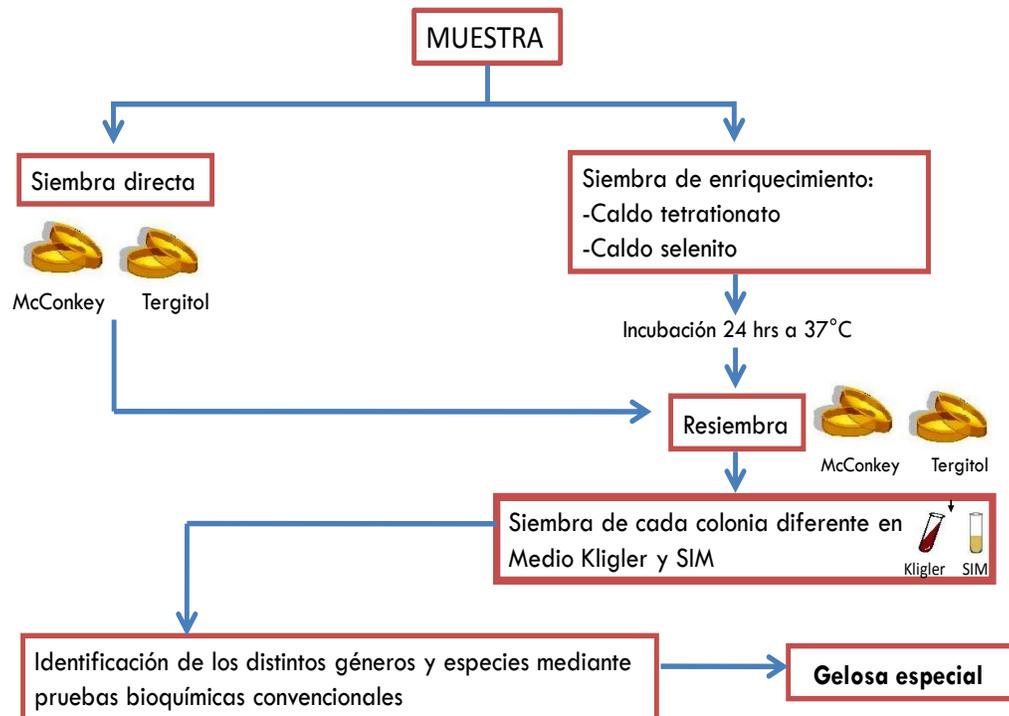


FIGURA 1.- Diagrama de flujo para la identificación de las cepas como *K. pneumoniae* a partir de las muestras de heces.

---

## Identificación mediante Enterotest

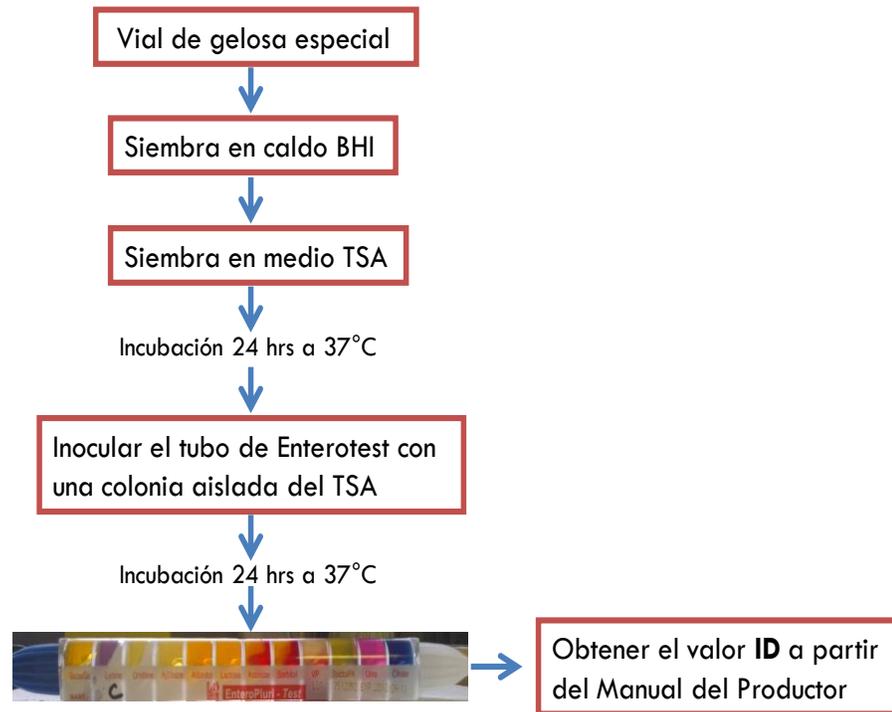


FIGURA 2.- Diagrama de flujo para la reidentificación de *K. pneumoniae* utilizando el sistema Enterotest.

---

## 8. RESULTADOS

Las cepas con las que se contó al inicio del estudio fueron 83, de las cuáles, 11 no se encontraron, las 72 cepas restantes se sembraron en caldo BHI pero no se obtuvo el crecimiento de 2 cepas, 6 cepas no correspondieron a *Klebsiella pneumoniae*, por lo tanto, quedaron 64 cepas que se utilizaron en el estudio.

Las parejas madre-hijo que resultaron fueron 16, de las cuales, 10 parejas fueron parto natural y 6 parto por cesárea.

Se utilizó un número diferente de muestras en cada binomio, debido a que en algunos meses no se logro obtener muestra o los microorganismos que se obtenían no eran *Klebsiella pneumoniae*.

En la figura 3 se muestra un ejemplo de los patrones de amplificación obtenidos con los 3 pares de iniciadores empleados, en este ejemplo se estudiaron 3 binomios madre-hijo.

Se construyó una base de datos en Excel en donde para cada una de las 64 cepas en estudio se registró el número de bandas de amplificación obtenidas con los 3 pares de iniciadores utilizados, así como el peso molecular calculado de cada banda; con estos datos se generó el Dendrograma mostrado en la figura 4, empleando el programa PAST.

Posteriormente, se construyeron dendrogramas para cada uno de los binomios madre-hijo a fin de establecer la similitud (ó disimilitud) entre las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de cada pareja (Fig 5) y compararlas con las semejanzas y diferencias de cada cepa en sus patrones de sensibilidad a los antibióticos y su ID obtenido mediante el sistema Enterotest (Tablas 2 Y 3).

En las figuras 6 a 21 se muestran los resultados de la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de 16 parejas madre-hijo estudiadas.

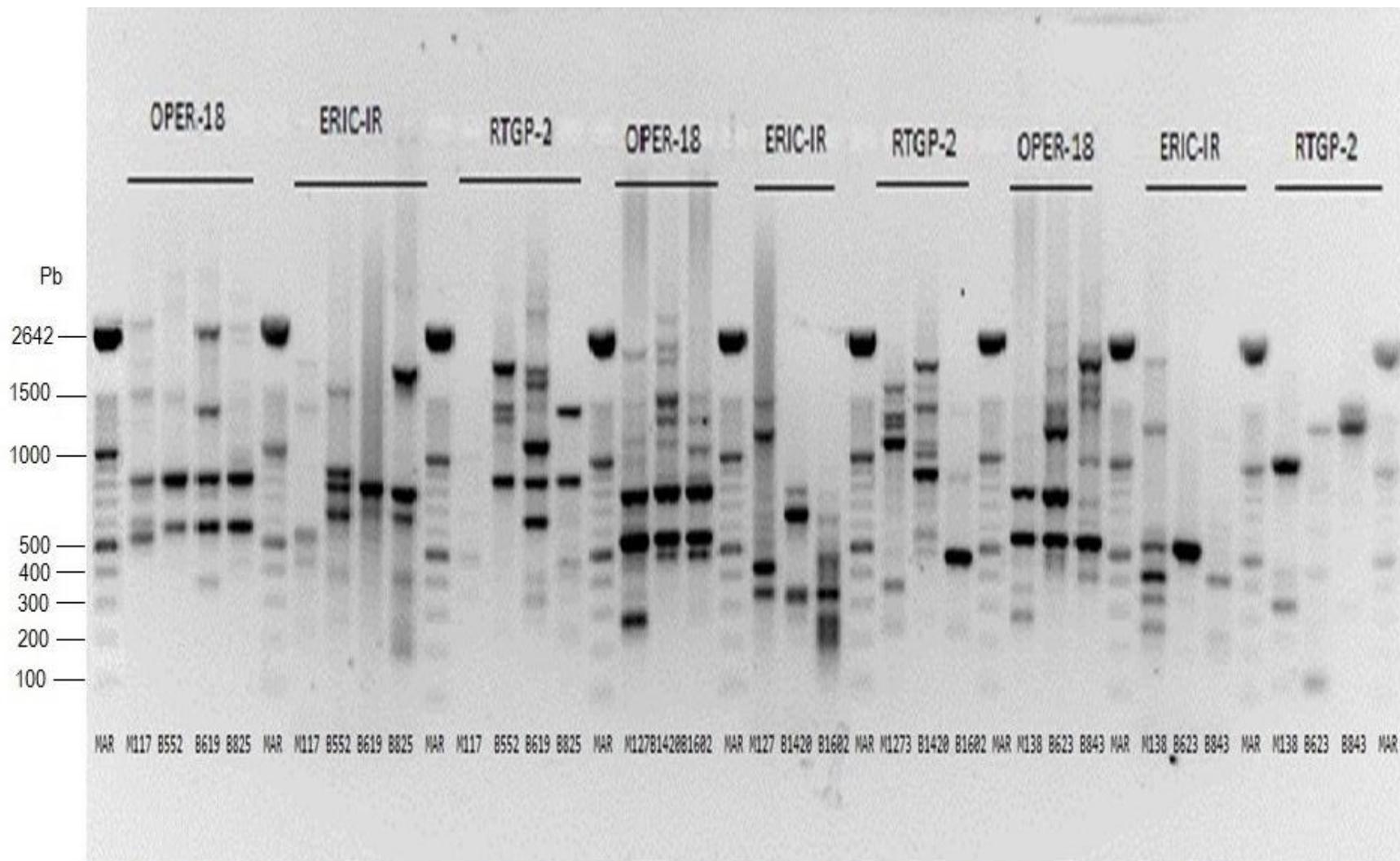


FIGURA 3.- Imagen de las bandas de DNA extraído de cepas de *Klebsiella pneumoniae* detectadas por el método de RAPD-PCR en un gel de agarosa al 1.2%, en el primer carril se observa el marcador de peso molecular XIV (100 pb Roche), en los carriles siguientes se encuentran las muestras M117, B552, B619, B825 amplificadas con el iniciador OPER-18, seguidas del marcador de peso molecular, se pueden ver la mismas muestras pero amplificadas con el iniciador RTGP-2 (Ready-To-Go-Primer-2), seguidas del marcador de peso molecular y posteriormente las mismas muestras ahora con el iniciador ERIC-1R, se puede observar el diferente patrón de amplificación que se obtiene con cada iniciador, se obtuvieron bandas de 107 pb-2630 pb.

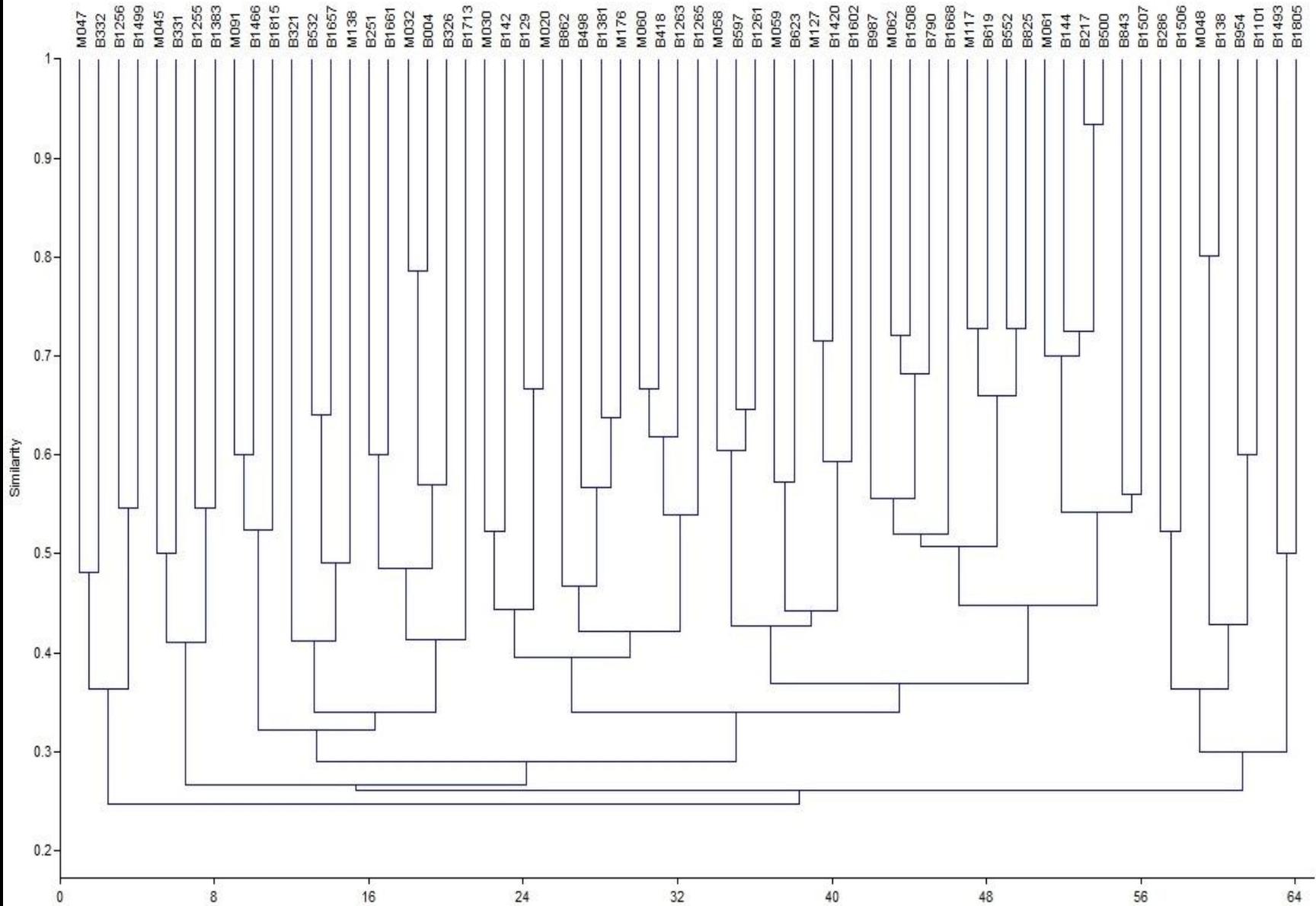


FIGURA 4.- Dendrograma general de las 64 cepas de *Klebsiella pneumoniae* estudiadas, en donde se puede observar la similitud que existe entre estas cepas, la similitud se observa en las agrupaciones que se forman.

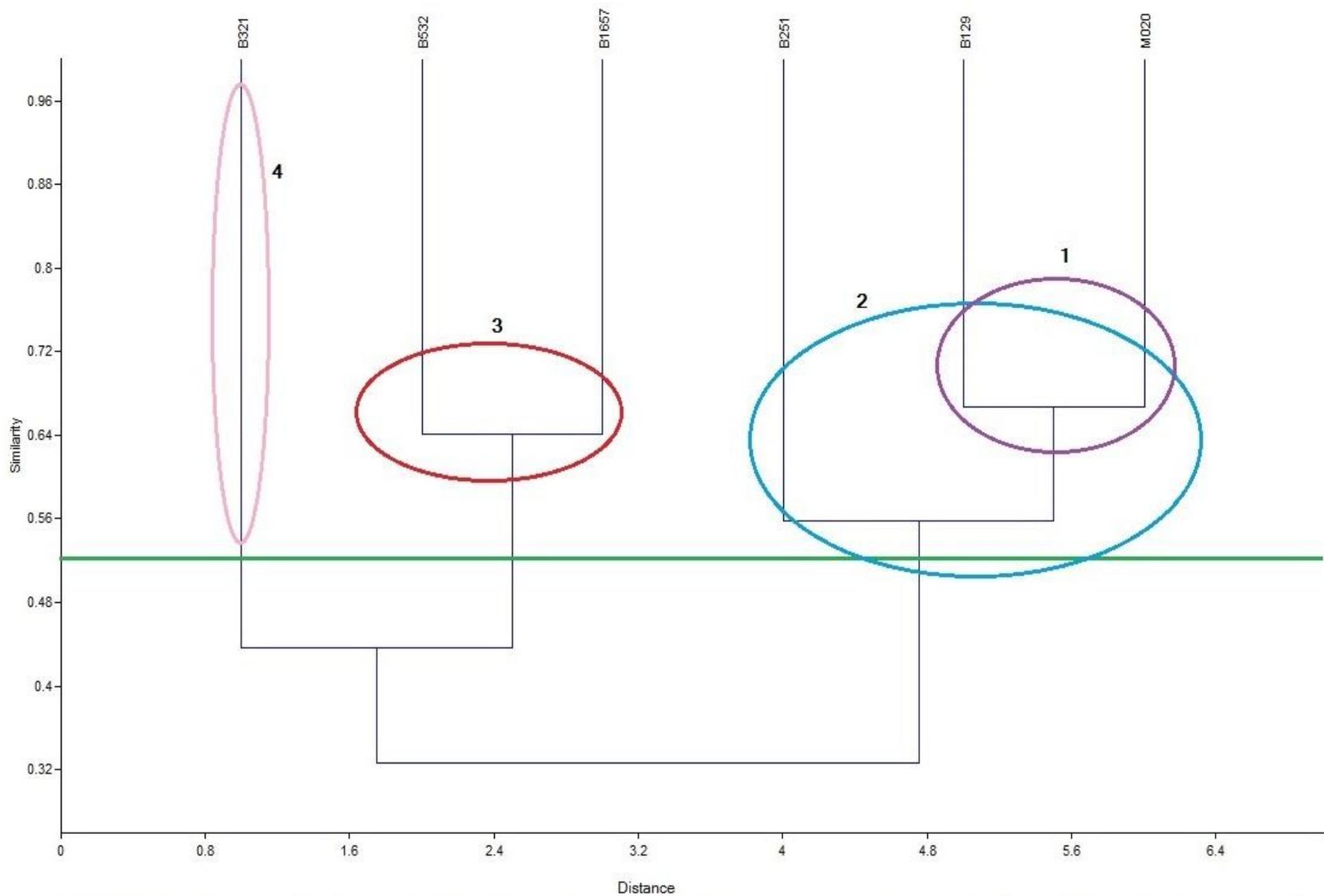


FIGURA 5.- Dendrograma en donde se muestra la similitud entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae*: en la agrupación 1(morado) se puede observar como la cepa M020 es igual a la cepa B129, en la agrupación 2 (azul) se observa que la cepa B251 es diferente a las cepas M020 y B129, en la agrupación 3 (rojo) se muestra como la cepa B1657 y B532 son iguales entre si pero diferentes a las cepa M020, B129, B251, y por último la cepa B321 (rosa) es diferente a las cepas anteriores.

TABLA 2.- Valor ID

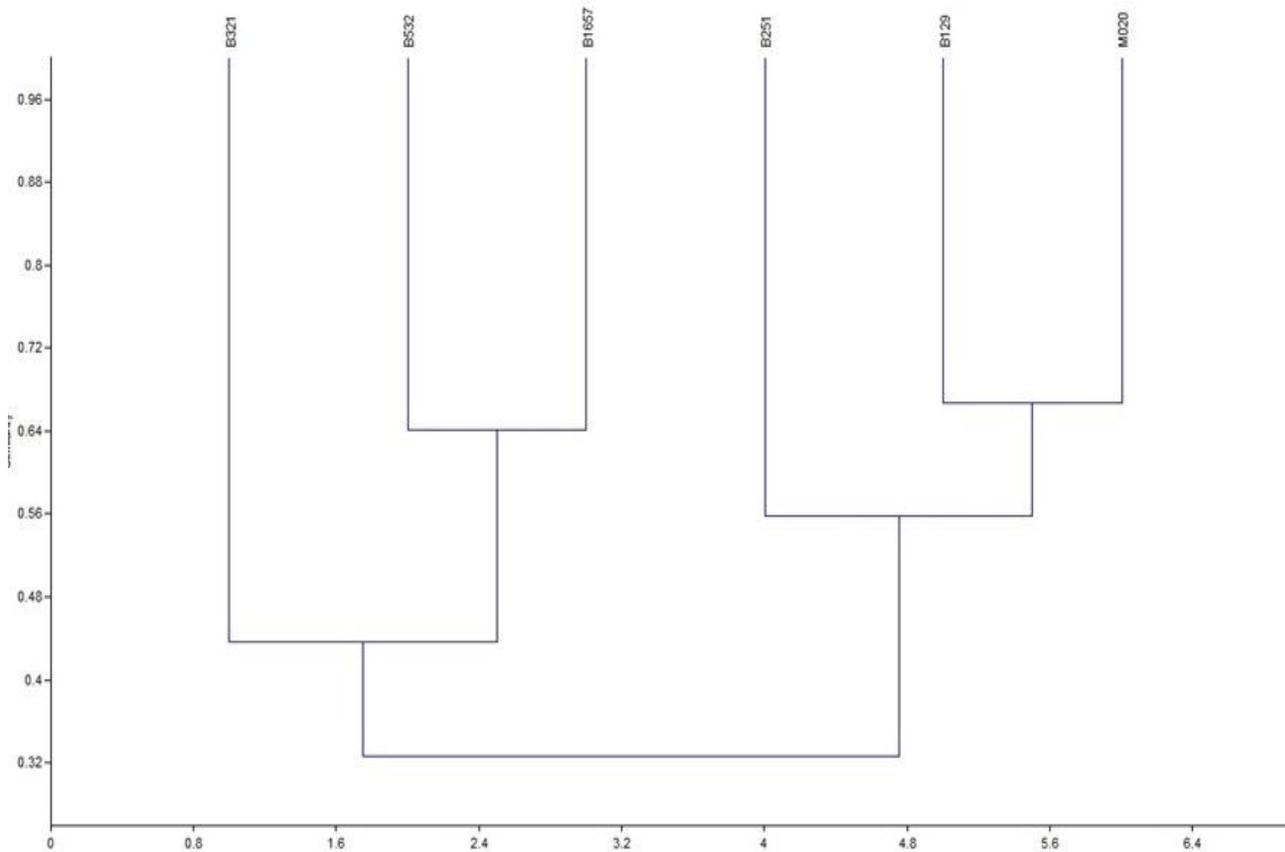
MUESTRA	VALOR ID
<b>M020</b>	<b>50363</b>
<b>B129</b>	<b>50773</b>
<b>B251</b>	<b>70773</b>
<b>B321</b>	<b>50763</b>
<b>B532</b>	<b>50773</b>
<b>B1657</b>	<b>50763</b>

Valor obtenido del EnteroPluri Test para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* en la cohorte de niños en Xoxocotla, Morelos.

TABLA 3 - Prueba de sensibilidad a los antibióticos

MUESTRA	ASLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
<b>M020</b>	<b>31/08/2010</b>	S	I	R	S	I	I	S	S	I	S	I	S
<b>B129</b>	<b>20/06/2011</b>	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>B251</b>	<b>27/06/2011</b>	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>B321</b>	<b>26/07/2011</b>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>B532</b>	<b>28/09/2011</b>	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>B1657</b>	<b>22/08/2012</b>	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S

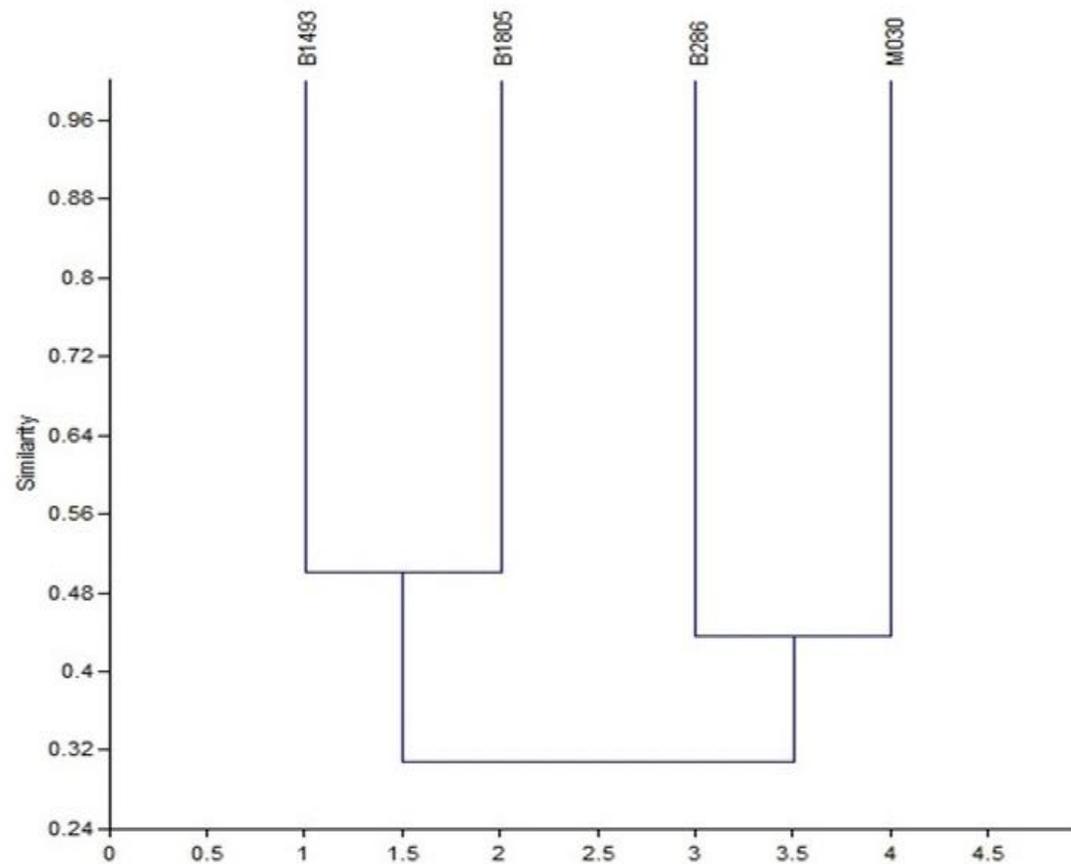
En esta tabla se muestra la prueba de sensibilidad a los antibióticos de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, esta prueba se utilizó para caracterizar fenotípicamente a estas cepas.



MUESTRA	VALOR ID
M020	50363
B129	50773
B251	70773
B321	50763
B532	50773
B1657	50763

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M020	31/08/2010	S	I	R	S	I	I	S	S	I	S	I	S
B129	20/06/2011	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B251	27/06/2011	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
B321	26/07/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B532	28/09/2011	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1657	22/08/2012	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S

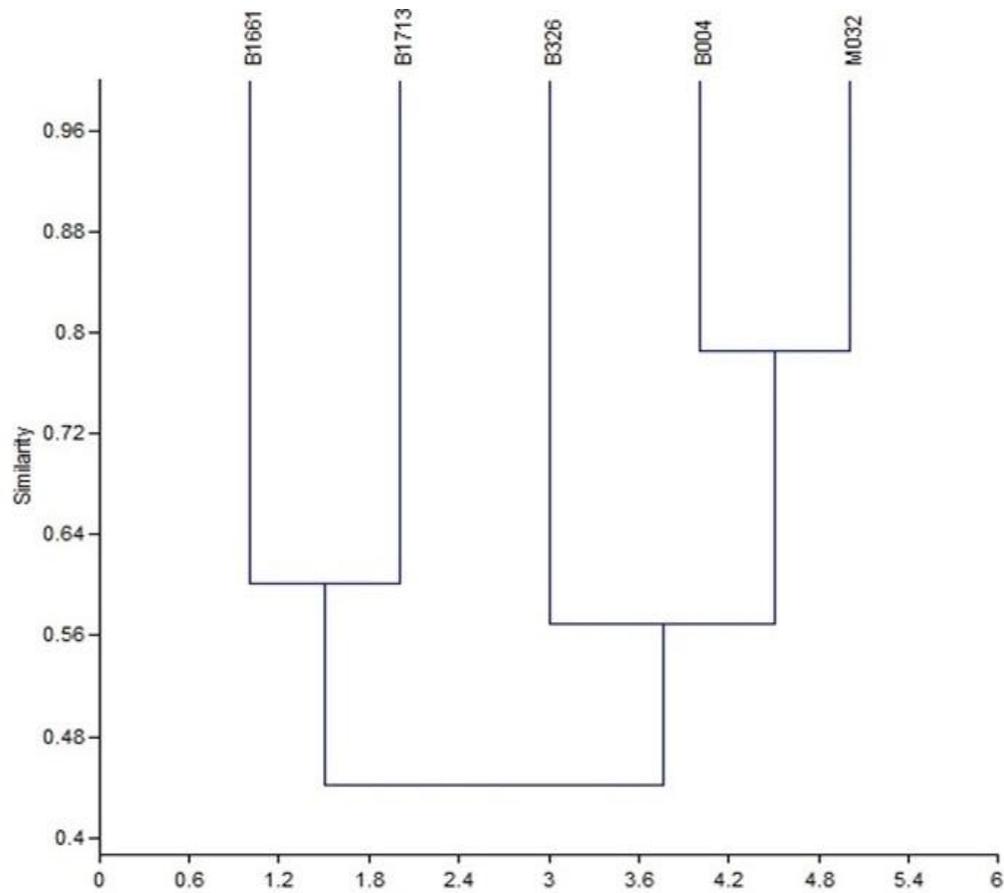
FIGURA 6.- Caracterización de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 1 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M030	70763
B286	50563
B1493	50363
B1805	50373

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M030	31/08/2010	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B286	20/06/2011	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
B1493	20/06/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1805	23/01/2013	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

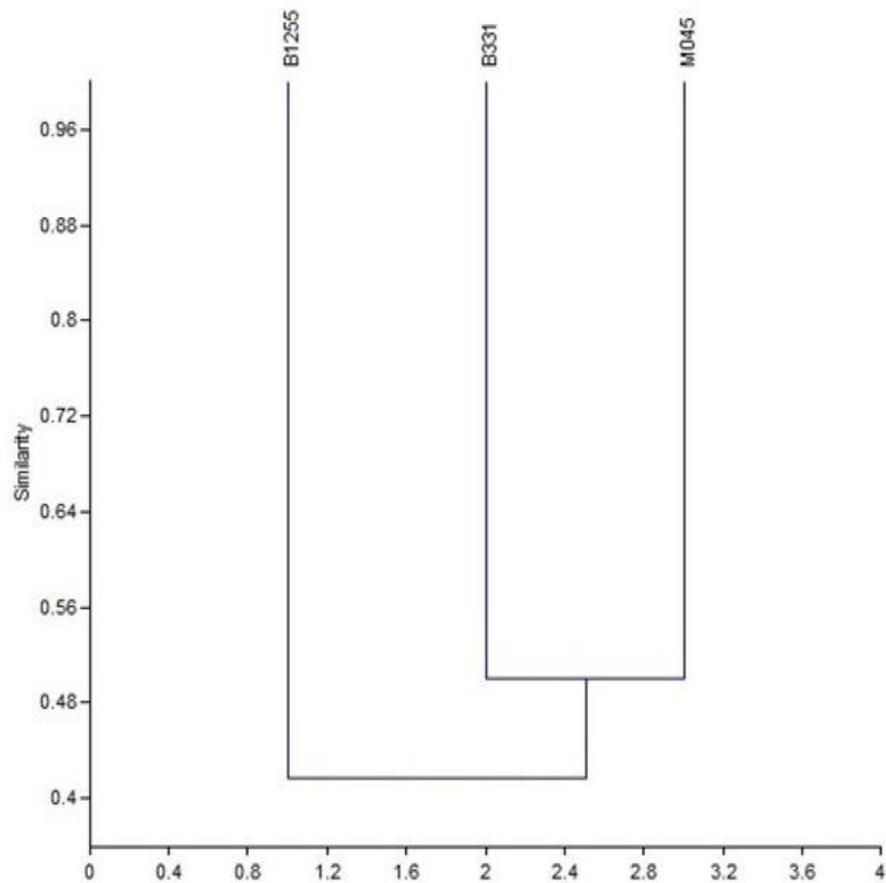
FIGURA 7.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 2 mediante RAPD-PCR, indentificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M032	70763
B004	70763
B326	50773
B1661	70763
B1713	50723

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoina	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M032	01/09/2010	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B004	03/11/2010	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
B326	26/07/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1661	22/08/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1713	19/09/2012	R	I	R	R	S	R	S	R	I	S	R	S

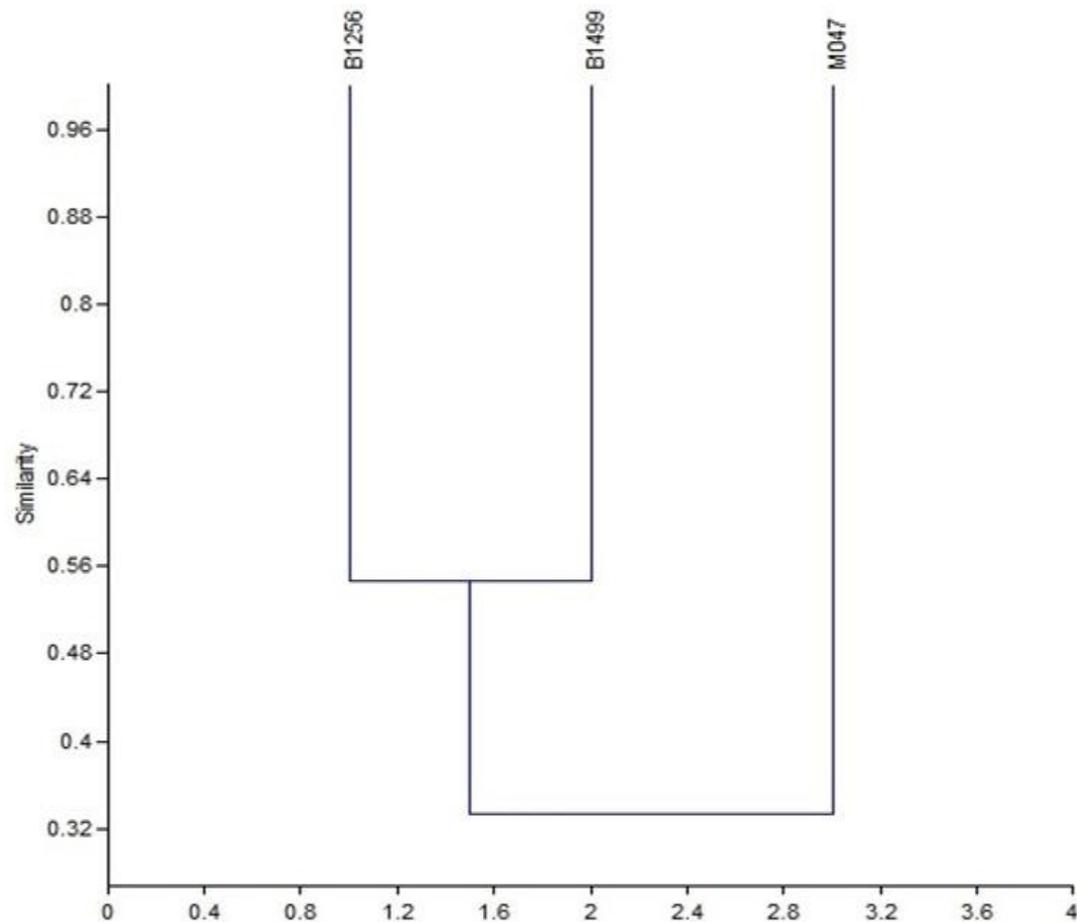
FIGURA 8.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 3 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
<b>M045</b>	70763
<b>B331</b>	70773
<b>B1255</b>	70763

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoina	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacin	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
<b>M045</b>	01/09/2010	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>B331</b>	26/07/2011	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>B1255</b>	18/04/2012	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S

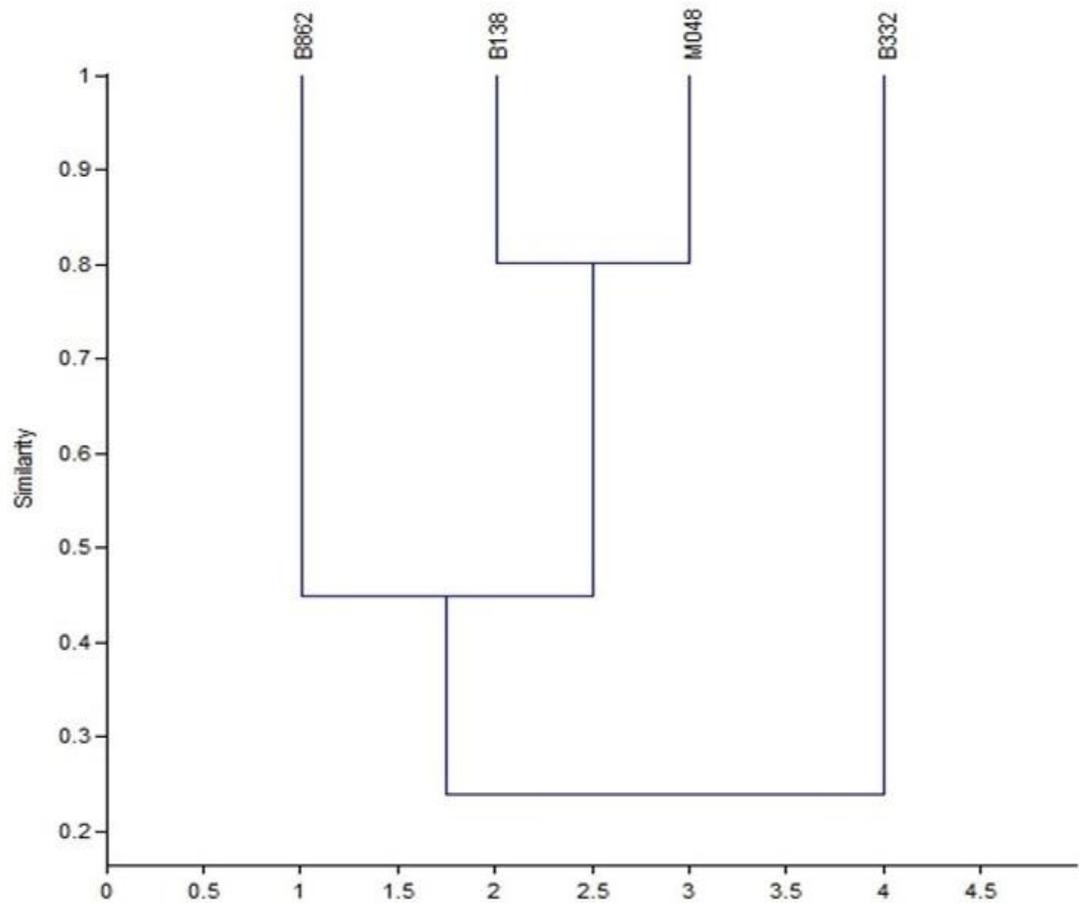
FIGURA 9.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 4 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M047	70773
B1256	50363
B1499	50763

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M047	01/09/2010	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1256	18/04/2012	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
B1499	20/06/2012	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

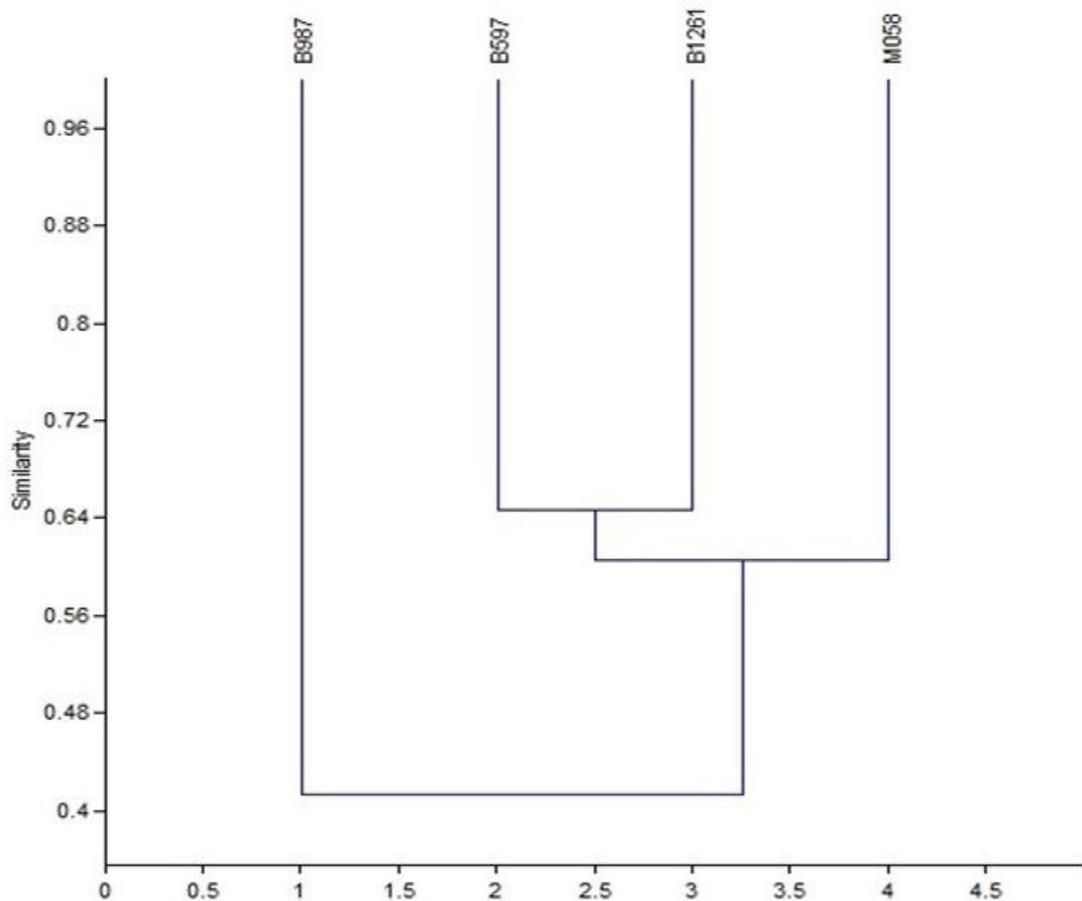
FIGURA 10.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 5 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M048	50773
B138	707763
B332	70363
B862	70773

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M048	01/09/2010	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B138	28/06/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B332	26/07/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B862	11/01/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

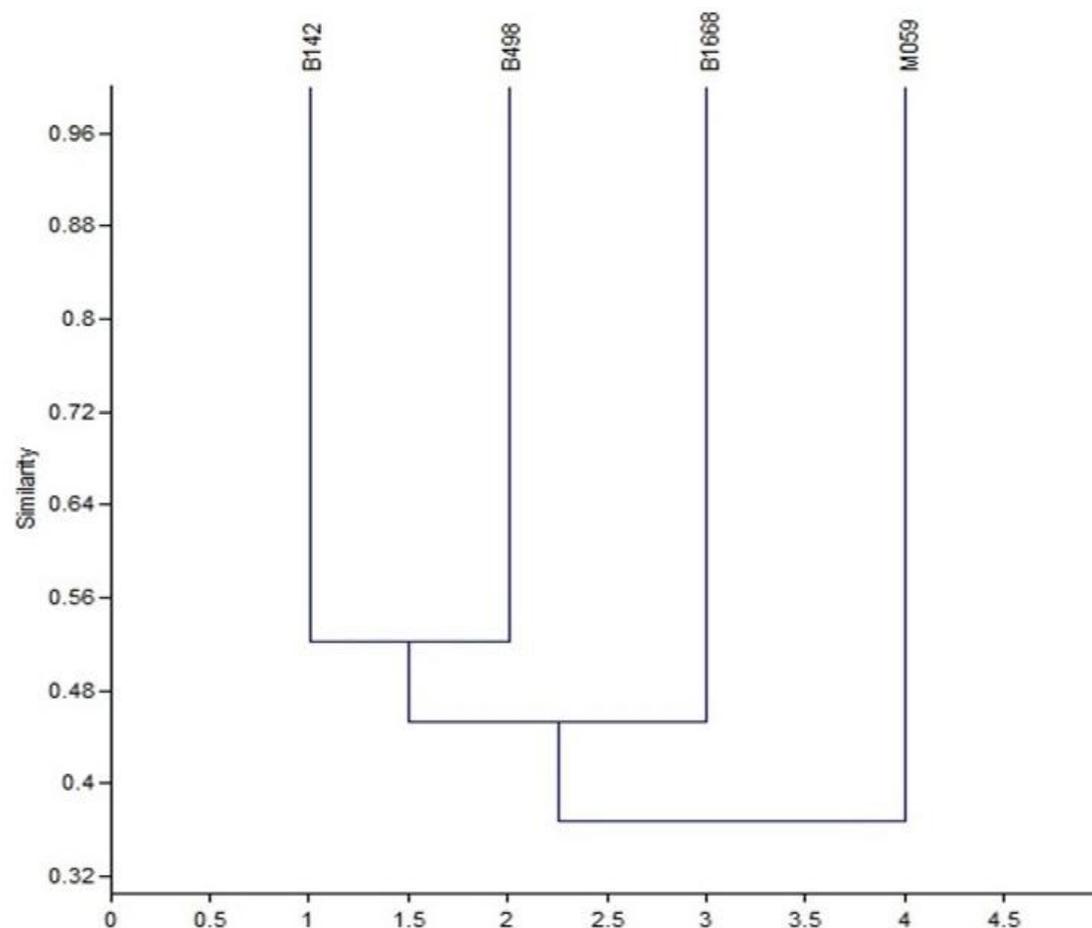
FIGURA 11.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 6 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M058	70363
B597	70773
B987	70773
B1261	70773

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M058	03/11/2010	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B597	27/10/2011	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
B987	02/02/2012	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	R	S
B1261	18/04/2012	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

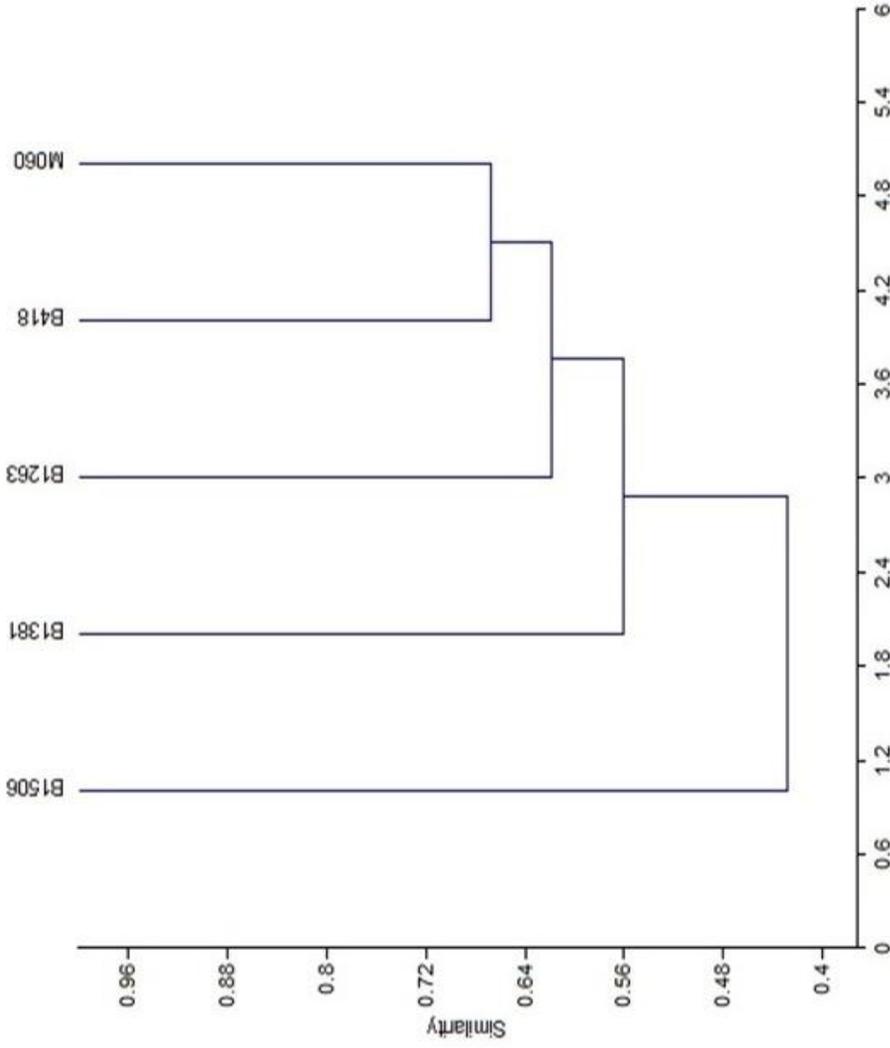
FIGURA 12.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 7 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M059	70373
B142	70763
B498	70773
B1668	50363

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M059	03/11/2010	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B142	28/06/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B498	21/09/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1668	22/08/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

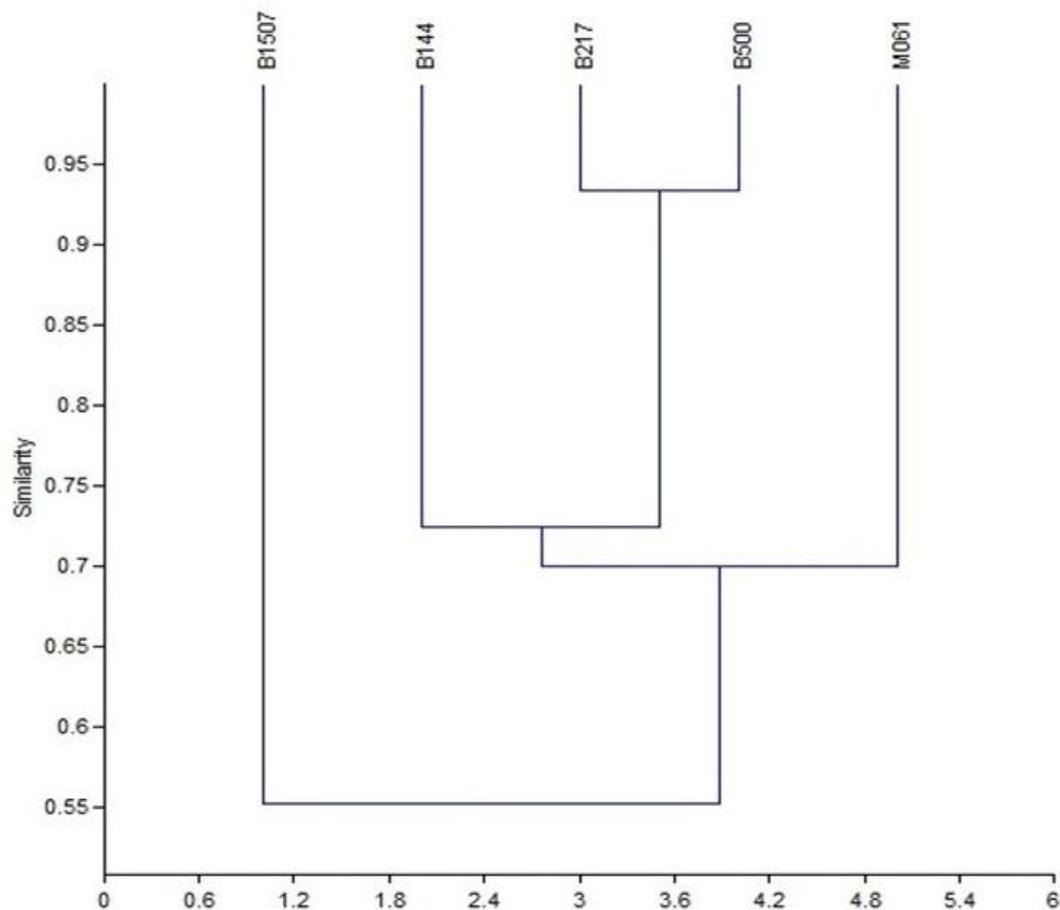
FIGURA 13.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 8 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M060	70773
B418	70763
B1263	50763
B1381	50763
B1506	70773

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoina	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M060	22/11/2010	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B418	24/08/2011	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1263	18/04/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1381	24/05/2012	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1506	20/06/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

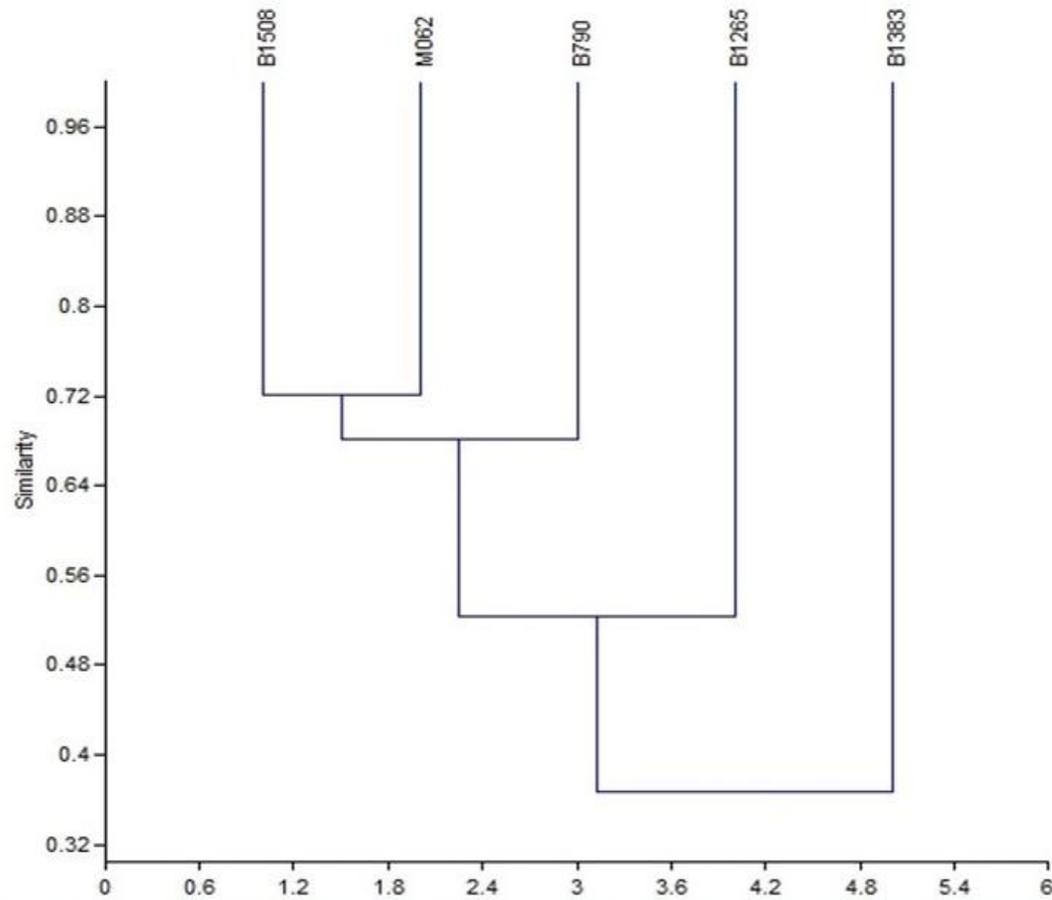
FIGURA 14.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 9 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Testy Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M061	70773
B144	70773
B217	70773
B500	70761
B1507	70363

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M061	22/11/2010	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B144	28/06/2011	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B217	06/06/2011	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	I	S
B500	21/09/2011	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1507	20/06/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

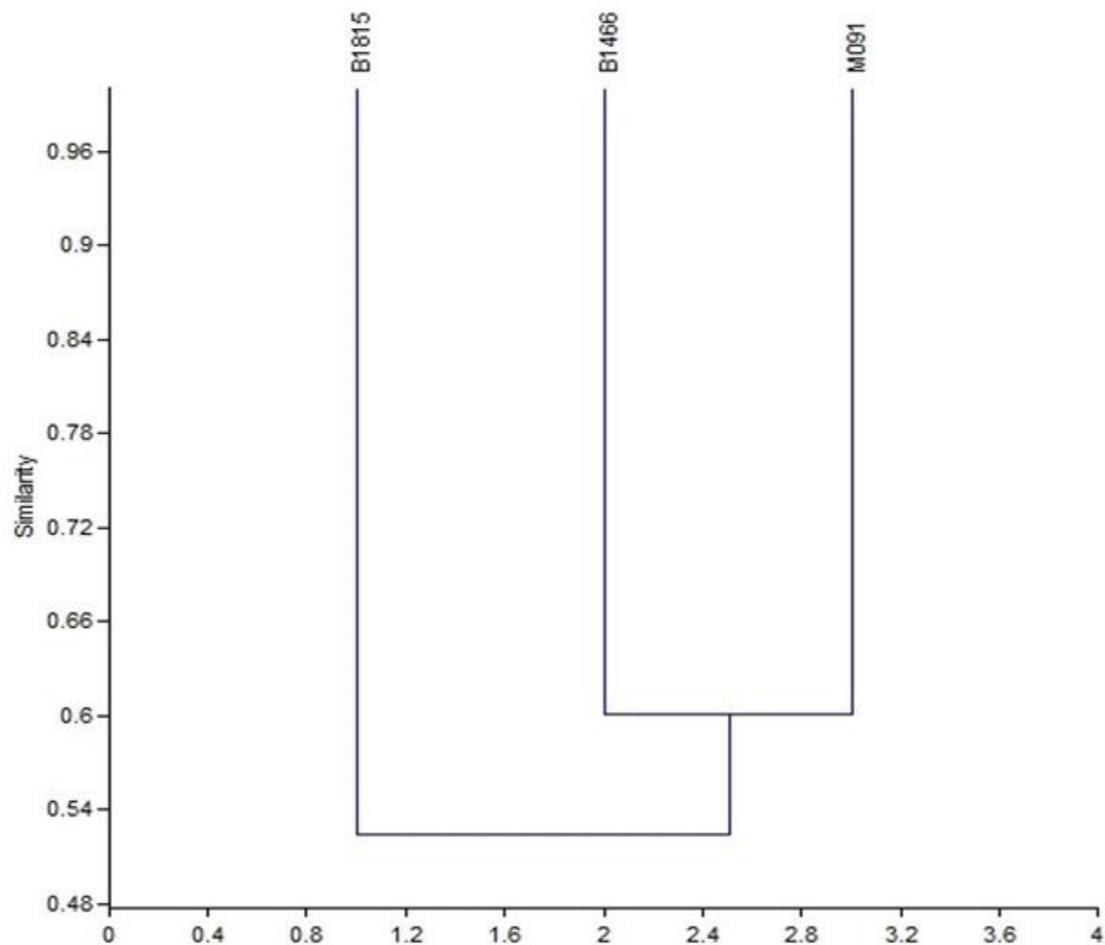
FIGURA 15.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 10 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M062	70763
B790	70763
B1265	70773
B1383	50773
B1508	70773

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M062	06/12/2010	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B790	04/01/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1265	18/04/2012	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1383	24/05/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1508	20/06/2012	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

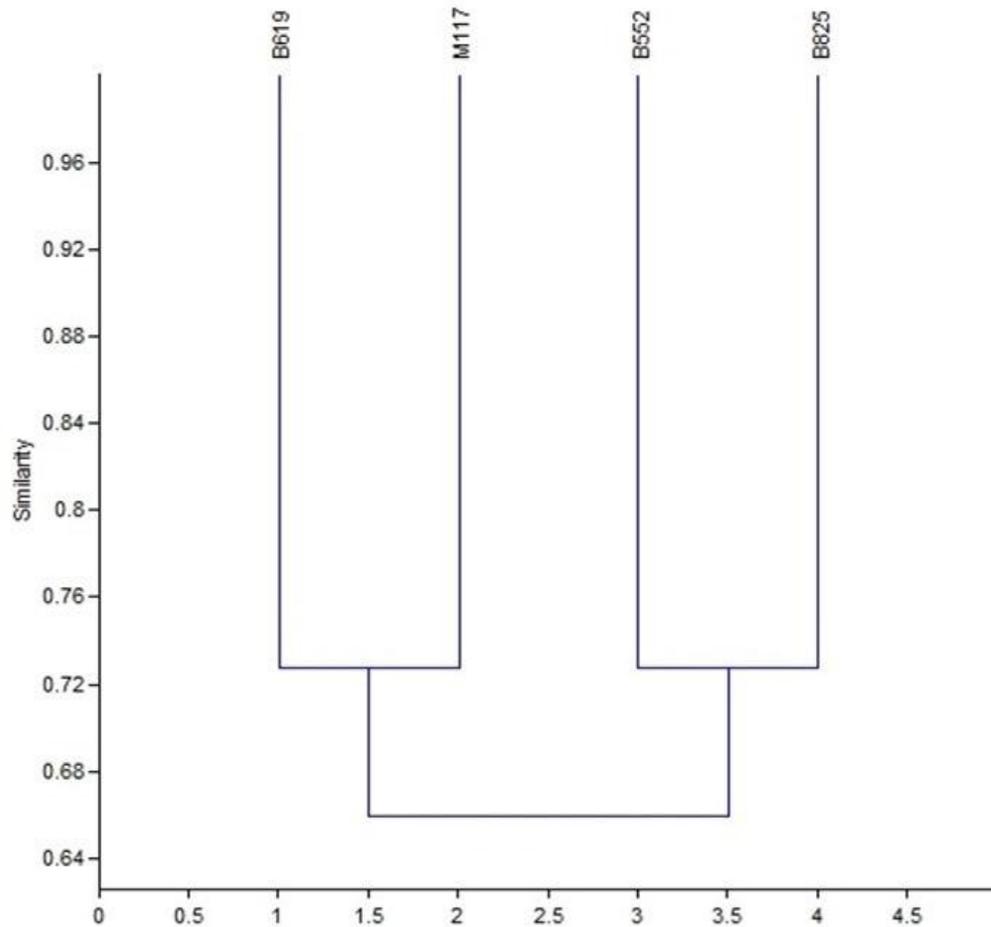
FIGURA 16.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 11 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M091	50333
B1466	70363
B1815	70763

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M091	24/02/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1466	30/05/2012	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
B1815	23/01/2013	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

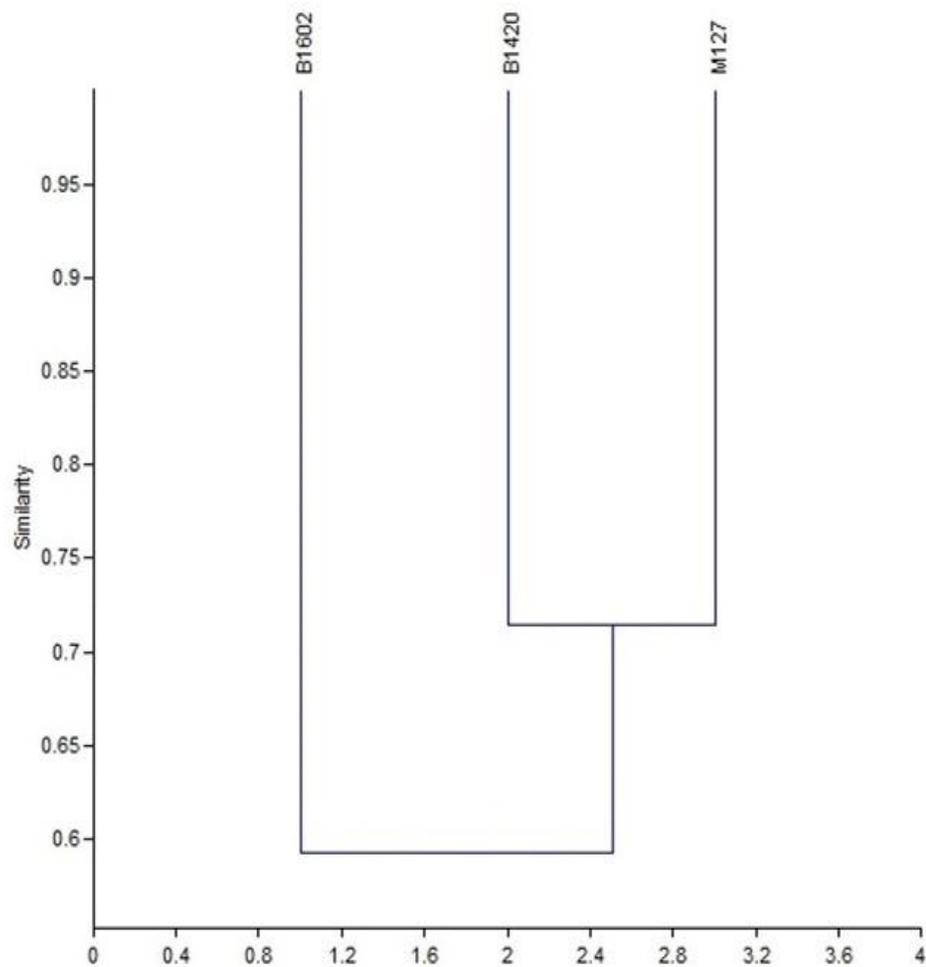
FIGURA 17.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 12 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M117	70373
B552	60773
B619	50763
B825	50763

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M117	27/07/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B552	28/09/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B619	27/10/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B825	04/01/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

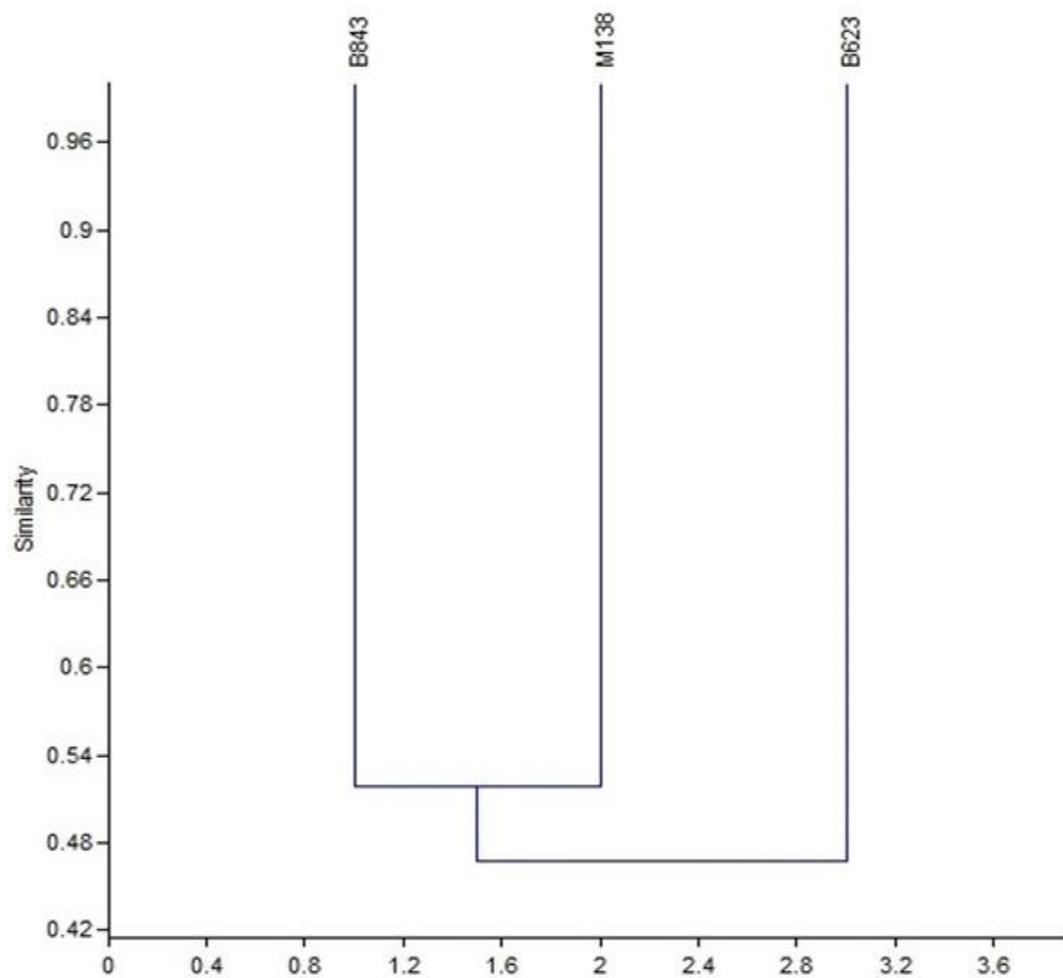
FIGURA 18.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 13 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M127	70773
B1420	70733
B1602	70763

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoína	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M127	04/08/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1420	24/05/2012	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
B1602	27/06/2012	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S

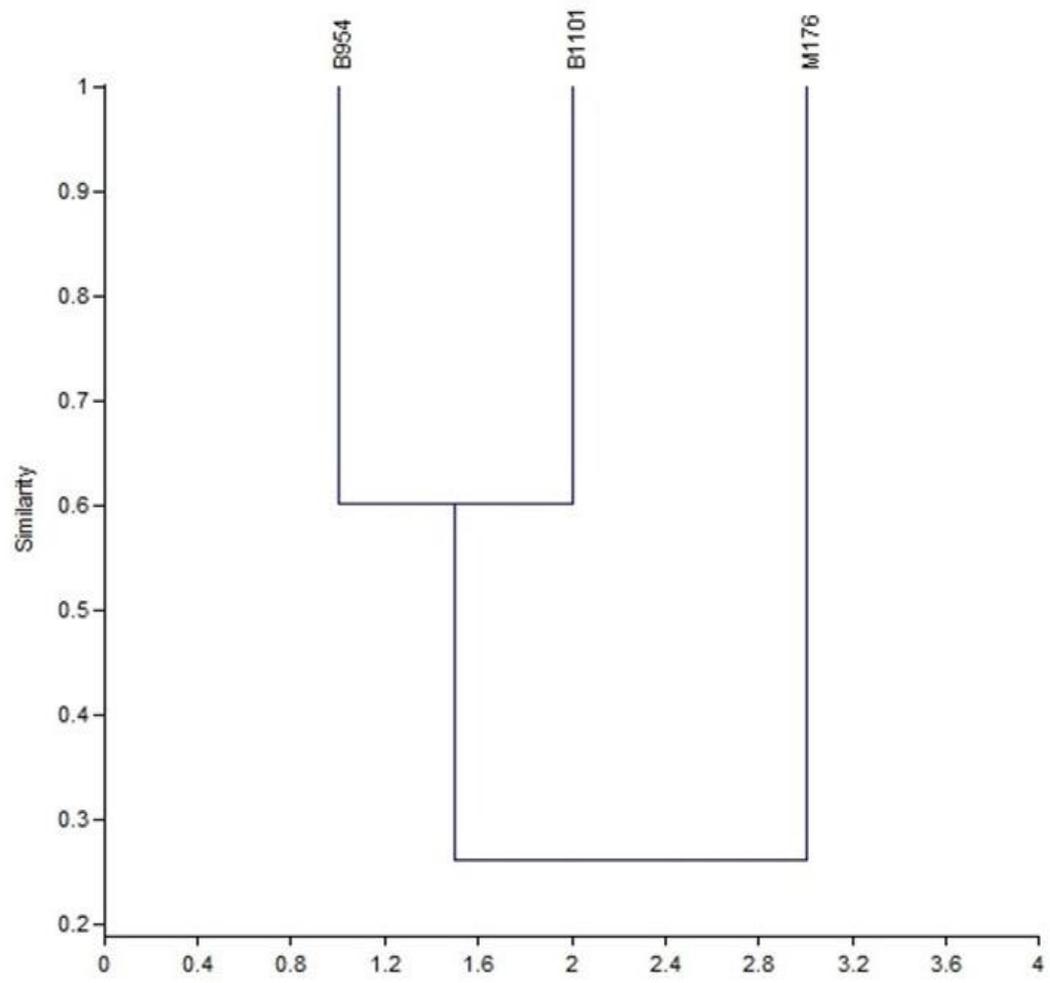
83 FIGURA 19.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 14 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M138	70363
B623	70773
B843	70763

MUESTRA	AISLAMIENTO	Nitrofurantoina	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacin	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M138	21/09/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B623	27/10/2011	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B843	04/01/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

FIGURA 20.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 15 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



MUESTRA	VALOR ID
M176	50363
B954	50363
B1101	70363

MUESTRA	ASLAMIENTO	Nitrofurantoina	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim-sulfametoxazol	Cefotaxima	Cefalotina	Cefepime	Levofloxacina	Cloranfenicol	Amikacina	Gentamicina	Netilmicina
M176	25/01/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B954	25/02/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B1101	29/02/2012	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

FIGURA 21.- Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* de la pareja Madre-Hijo No. 16 mediante RAPD-PCR, identificación por EnteroPluri Test y Prueba de sensibilidad a los antibióticos.

Con los resultados obtenidos definimos 2 tipos de patrones de colonización de *K. pneumoniae*:

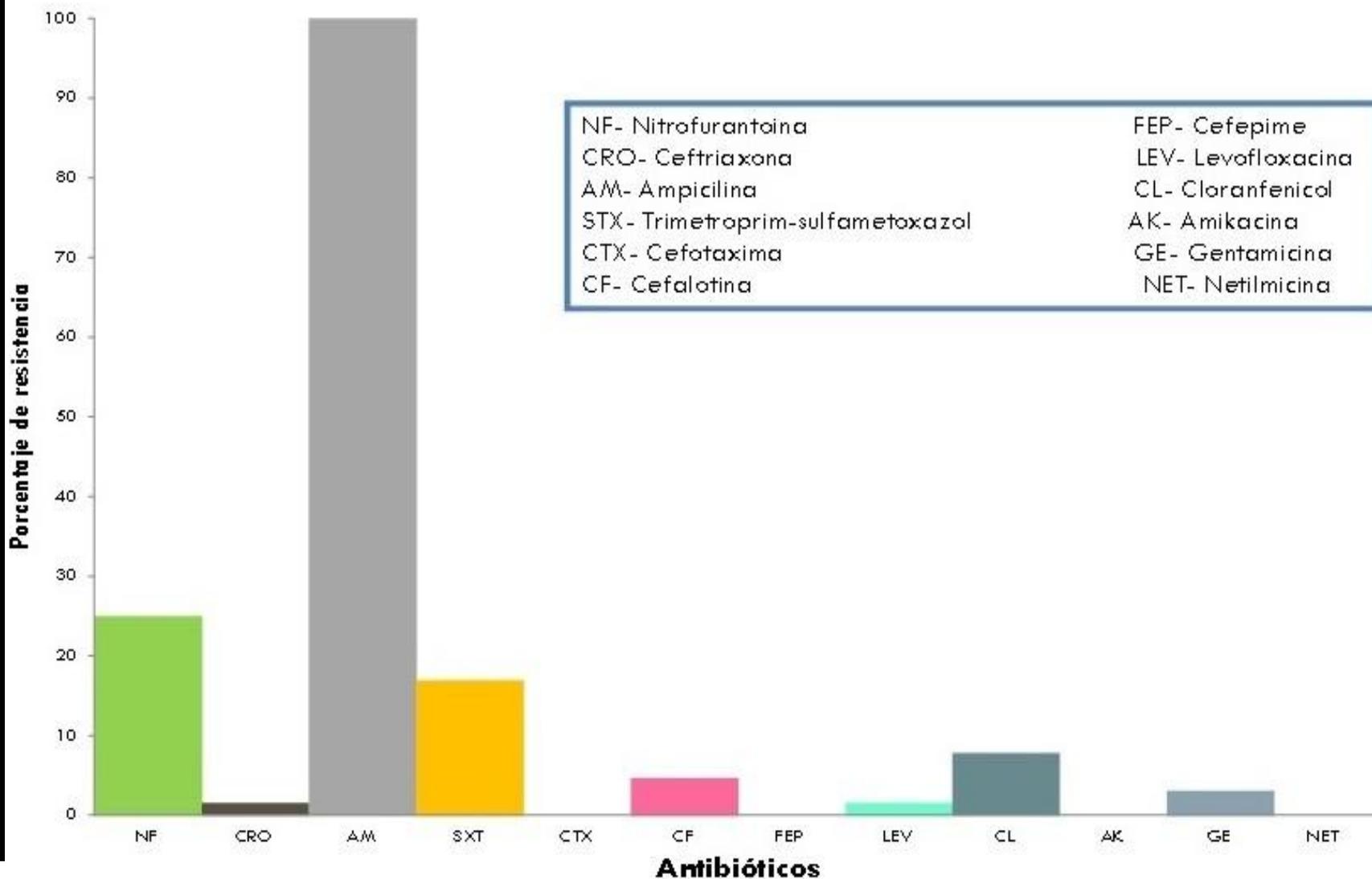
- 1) Las cepas aisladas inicialmente del niño se parecen a la cepa de la madre y posteriormente por aislamientos del niño cada vez son más diferentes al materno.
- 2) Las cepas aisladas del niño no guardan ninguna relación (o bien una relación menor) con la cepa materna.

En la tabla 4 que se muestra a continuación se relacionan los 2 patrones de colonización definidos y el tipo de parto.

TABLA 4.- Patrones de colonización por *K. pneumoniae* en la cohorte de recién nacidos de Xoxocotla, Mor.

Tipo de patrón de colonización	Definición	Parejas madre-hijo	Tipo de parto
I	Las cepas aisladas inicialmente son semejantes a las maternas y posteriormente se identifican cepas distintas	-2, 4, 12, 14	-Parto normal
		-1, 3, 9	-Cesárea
II	Las cepas aisladas a o largo del estudio son diferentes a las maternas	-5, 6, 7, 8, 11, 16	-Parto normal
		-10, 13, 15	-Cesárea

TABLA 5.- Porcentaje de resistencia a los antibióticos de las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas.



---

## 9.- DISCUSIÓN

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo Gram (-), perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que coloniza de manera normal el tracto gastrointestinal humano y que eventualmente puede actuar como patógeno oportunista principalmente en el caso de neonatos.<sup>(8)</sup>

En un estudio longitudinal realizado en una cohorte de recién nacidos sanos del poblado de Xoxocotla, Morelos, el género *Klebsiella* ocupó el segundo lugar en frecuencia de aislamientos a lo largo de 2 años y en estudios anteriores *Klebsiella pneumoniae* se detectó en el 30% de los recién nacidos.<sup>(27)</sup> Por este motivo se decidió utilizar a *Klebsiella pneumoniae* como un microorganismo indicador de la colonización por Enterobacterias en los niños de la cohorte.

Con el propósito de realizar una identificación precisa se decidió utilizar sistemas de caracterización fenotípicos y genotípicos y compararlos entre sí.

Se utilizó la caracterización por biotipos utilizando un sistema comercial sencillo, económico, de fácil acceso y reproducible, basado en la asignación de códigos de identificación a partir de una serie de reacciones bioquímicas características de las Enterobacterias.

Así también, se utilizó la determinación de los patrones de sensibilidad y resistencia a los antibióticos como un sistema de seguimiento de las cepas en estudio y para establecer los niveles de resistencia a los antibióticos en la población analizada, los datos que obtuvimos en resistencia fueron: Nitrofurantoína 25%, Ceftriaxona 1.56% Ampicilina 100%, Trimetoprim-Sulfametoxazol 17.18%, Cefotaxima 0%, Cefalotina 4%, Cefepime 0%, Levofloxacin 1.56%, Cloranfenicol 7.8%, Amikacina 0%, Gentamicina 3.2% y Netilmicina 0%.

---

Por otra parte, dentro de los sistemas de caracterización genotípicos, se empleó el RAPD-PCR ya que permite el análisis de todo el genoma bacteriano y que es, así mismo, un sistema reproducible y sencillo de realizar y analizar. En nuestro caso se decidió utilizar 3 iniciadores con el propósito de tener una identificación más precisa de cada aislamiento bacteriano, de acuerdo a lo sugerido con Fegan y col. los cuales dicen que una banda sólo se considera significativa si está presente por duplicado.<sup>(13)</sup>

El empleo de estos sistemas de caracterización nos permitió identificar a las cepas individualmente y hacer un seguimiento de la colonización de *K. pneumoniae* de los niños de la cohorte y comparar las cepas aisladas de los niños con aquellas aisladas por de las madres respectivas.

Al establecer los porcentajes de similitud de las 64 cepas estudiadas no encontramos agrupaciones (clusters) que tengan una asociación evidente con la epidemiología bacteriana; así demostramos una gran diversidad poblacional de los aislamientos de *K. pneumoniae*, esto también se observó en un estudio anterior en donde se obtuvieron cepas con diferente fenotipo que fueron divididas en 11 genotipos diferentes.<sup>(25)</sup>

Debido a esta heterogeneidad de las 64 cepas de *K. pneumoniae* estudiadas, analizamos los porcentajes de similitud entre las cepas aisladas de la madre-hijo y definimos 2 tipos de patrones de colonización por *K. pneumoniae*: 1) Un patrón en el que las cepas que colonizan inicialmente a los niños son semejantes a las maternas y posteriormente esta similitud es cada vez menor conforme pasa el tiempo de seguimiento y 2) Un patrón de colonización donde la similitud de las cepas aisladas de las madres e hijos es pequeña y se vuelve aún menor conforme el tiempo transcurre.

---

En ambos casos, en general se observó que conforme transcurrió el seguimiento de la población infantil, la diversidad de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas fue cada vez mayor, lo que sugirió que conforme madura el tracto gastrointestinal del niño cambian las presiones selectivas del ambiente y por lo mismo se van seleccionando cepas cada vez más adaptadas a este ecosistema modificado; de acuerdo a este modelo, una vez que las presiones selectivas del ambiente se estabilizan, así también el recambio poblacional bacteriano será menor.

Por otra parte, decidimos agrupar a los binomios madre-hijo tomando como base el tipo de nacimiento (parto normal o cesárea) para tratar de establecer si este influye en la manera en que se coloniza el recién nacido; en este caso no encontramos que hubiese asociación entre el tipo de nacimiento y los patrones de colonización por *K. pneumoniae*, lo que nos sugiere que el recién nacido se coloniza a partir de la flora microbiana del ambiente, posiblemente a partir de la persona encargada del cuidado del recién nacido (madre, abuela, hermana, etc.).

La hipótesis de que la colonización de los recién nacidos se realiza a partir de la flora microbiana del cuidador está apoyada por el hecho desde las primeras semanas de nacimiento se aislaron e identificaron cepas resistentes a los antibióticos, los cuales necesariamente fueron transferidas de un adulto con experiencias previas de antibioticoterapia; en este sentido llama la atención que existe una gran heterogeneidad en los patrones de resistencia a los antibióticos, lo que confirma la variabilidad de las cepas colonizadoras.

Estudios previos dicen que la colonización bacteriana del recién nacido se realiza principalmente en el canal de parto y a partir de la flora de la madre (26), este trabajo aporta una serie de evidencias que permiten postular que la

---

colonización se realiza a partir de medio ambiente y que la madre no necesariamente funciona como donadora de la microbiota del hijo.

---

## 10.- CONCLUSIONES

- El objetivo general se cubrió satisfactoriamente.
- Se logró identificar a las cepas de *K. pneumoniae* a partir de una colección bacteriana.
- Los patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos permitieron una caracterización apropiada de las cepas.
- Los patrones de RAPD-PCR analizados mediante el programa PAST proporcionaron la caracterización más precisa de las cepas.

---

## 11.- REFERENCIAS

1. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma F.F, Snijders B, Kummeling I, Brandt P, Stobbering E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in the early infancy. *Pediatrics* 2006; 2:511-521.
2. Falk P.G, Hooper L.V, Midtvedt T, Gordon J.I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62:1157-1170.
3. Guarner F, Malagelada J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-519.
4. Mackie R.I, Sghir A, Gaskins R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69:1035S-1045S
5. Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2000; 2:53-63
6. Palmer C, Bik E.M, DiGiulio D.B, Relman D.A, Brown P.O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology* 2007; 5:1556-1573
7. Bernard D. *Tratado de Microbiología* 2º ed. Ed. Salvat Editores Barcelona. 1979
8. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology* 7<sup>th</sup> Ed. American Society for Microbiology Press. 1999. Washington DC, USA. pp 1773.
9. Hennequin C, Robin F, Cabrolier N, Bonnet R, Forestier C. Characterization of DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* strain involved in an outbreak: a role of Ampr regulator in virulence. *Antimicro. Agents Chemother.* 2011; 7:288-294



- 
18. Tortora G.J, Funke B.R, Case C.L. Clasificación de los Microorganismos. En: Introduccion a la Microbiologia 2007 Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
19. EnteroPluri – Test. Manuale dei Codici. Codebook. Liofilchem Bacteriology Products. Roseto D. A. Italy. 2005. pp175.
20. Pimenta-Rodriguez M.V, Fusco Almeida A.M, Bertoni B.W, Pietro RCLR. Assessment of genetic Relationship between *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* Samples Isolated from a Dental Office. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 1994; 14:703-718.
21. Vogel L, Jones G, Triep S, Koek A, Dijkshoom L. RAPD Typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Using Standardized Reagents. Clin. Microbiol. Infect. 1999; 5:270-276
22. Ortiz-Herrera M, Gerónimo-Gallegos A, Cuevas Schacht F, Pérez Fernández L, Coria-Jiménez R. Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fq. Salud Pú. Méx. 2004; 46: 149-157.
23. Hammer, Q, Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST:Paleontological statistiscs software package for education and data analysis. Palaentologia Electronica 4 (1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/apst/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/apst/issue1_01.htm)
24. <http://mexico.pueblosamerica.com/i/xoxocotla/>
25. Aladag M, Uysal A, Dundar N, Durak Y, Gunes E. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urinary tract infections: detection of ESBL characteristics, antibiotic susceptibility and RAPD genotyping. Polish J Microbiol. 2013 4:401-409.
-

---

26. Caroline L, Karlsson J, molin G, Corrado M, Ahrné S. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term. International Pediatric Research Foundation U.S.A 2011 3:282-286.

---

## 12. ANEXOS

### I. INTERPRETACION DE ENTEROTEST PLUS

Al final de la incubación

- a. Realizar la prueba de Indol colocar el EnteroPluri Test con la superficie plana apuntando hacia arriba y por una punción en la película de plástico inyectar con una jeringa 3 o 4 gotas del reactivo de Kovacs en el sector H<sub>2</sub>S/Indol

La reacción es positiva si se observa un color rojo-rosado en el reactivo añadido dentro de 10-15 segundos.

- b. Para la prueba Voges-Proskauer: Coloca el EnteroPluri Test de la misma manera que en la prueba de Indol, inyectar con una jeringa 3 gotas de α-naftol (reactivo 1) y 2 gotas de Hidróxido de Potasio (reactivo 2).

La reacción es positiva si se observa un color rojo dentro de 20 minutos.

- c. Observar el cambio de color en los diferentes sectores.

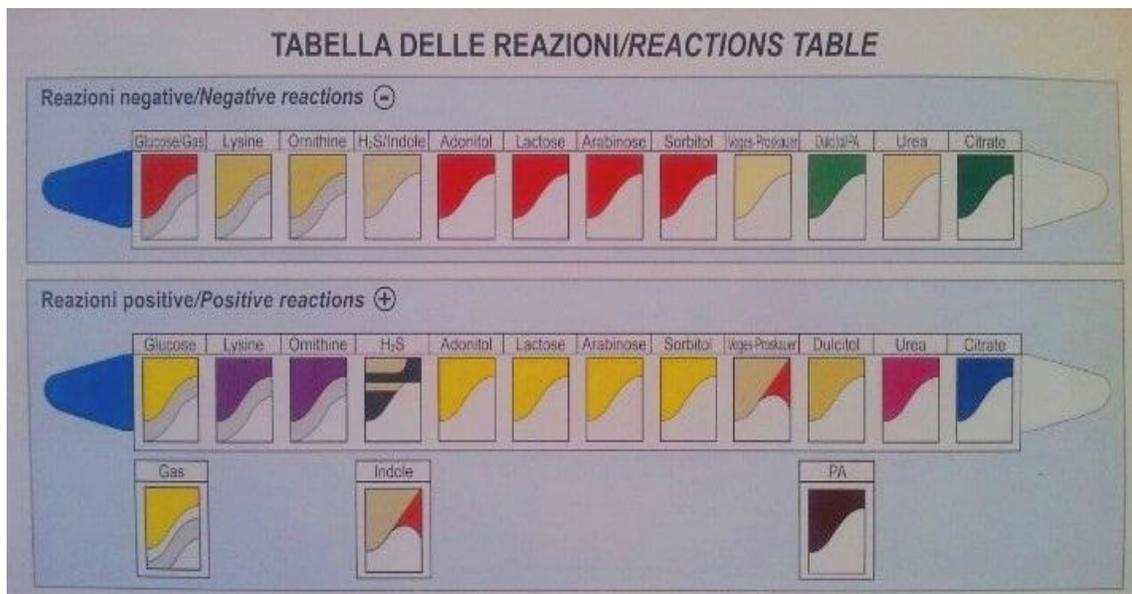


FIGURA 22: Interpretación de los resultados de Enterotest Plus.

## II. OBTENCION DEL VALOR ID DE ENTEROTEST PLUS

a. Las 15 pruebas bioquímicas de EnteroPluri Test están divididas en 5 grupos cada uno contiene 3 pruebas y cada uno está indicado con un valor de positividad 4, 2, 1.

- Valor 4: La primera prueba positiva en cada grupo (Glucosa, Ornitina, adonitol, Sorbitol, PA)
- Valor 2: La segunda prueba positiva en cada grupo (Gas, H<sub>2</sub>S, Lactosa, VP, Urea)
- Valor 1: La tercera prueba positiva de cada grupo (Lisina, Índol, Arabinosa, Dulcitol, Citrato)
- Valor 0: Todas las pruebas negativas.

### MODULO DATI / DATA CHART

DATA DATE	CAMPIONE SAMPLE														
Test	GROUP 1			GROUP 2			GROUP 3			GROUP 4			GROUP 5		
	Glucose	Gas	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Indole	Adonitol	Lactose	Arabinose	Sorbitol	VP	Dulcitol	PA	Urea	Citrate
Codice di positività Positivity code	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Risultati Results	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Somma dei codici Code sum	7			0			7			7			3		
CODICE NUMERICO NUMERICAL CODE	70773						MICROORGANISMO MICROORGANISM			<i>Klebsiella pneumoniae</i>					

FIGURA 23: Tabla de códigos para la identificación por EnteroPluri Test

## III. ELABORACION DE DENDROGRAMAS:

- Obtener el R<sub>f</sub> de cada una de las bandas obtenidas en la electroforesis.
- Construir una grafica log PM/R<sub>f</sub>
- Se interpoló en R<sub>f</sub> en la grafica y al valor obtenido se le calculó el antilogaritmo para conocer los pesos moleculares de cada banda.

- d. Se realizó una base de datos con los pesos moleculares de las bandas que se obtuvieron de todas las muestras.
- e. Se juntó el número de bandas de los 3 iniciadores en cada muestra, estos se colocaron en la base de datos en donde la presencia de las bandas se marcaba con 1 y la ausencia con 0.

	2630	2291	2138	1995	1862	1738	1622	1513	1412	1349	1259	1175	1096	1023	955	891	832	776
M020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
B129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B251	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B321	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B532	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1657	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B286	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1493	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B1805	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M032	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B004	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
B326	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B1661	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B1713	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M045	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B331	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
B1255	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
M047	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
B1256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M048	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B138	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B332	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B862	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
M058	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B597	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B987	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
B1261	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
M059	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
B498	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
B1688	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M060	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B418	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1263	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
B1381	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FIGURA 24. Base de datos para la construcción de dendrogramas.

f. Estos datos se pasaron al programa PAST en donde se construyeron los dendrogramas.

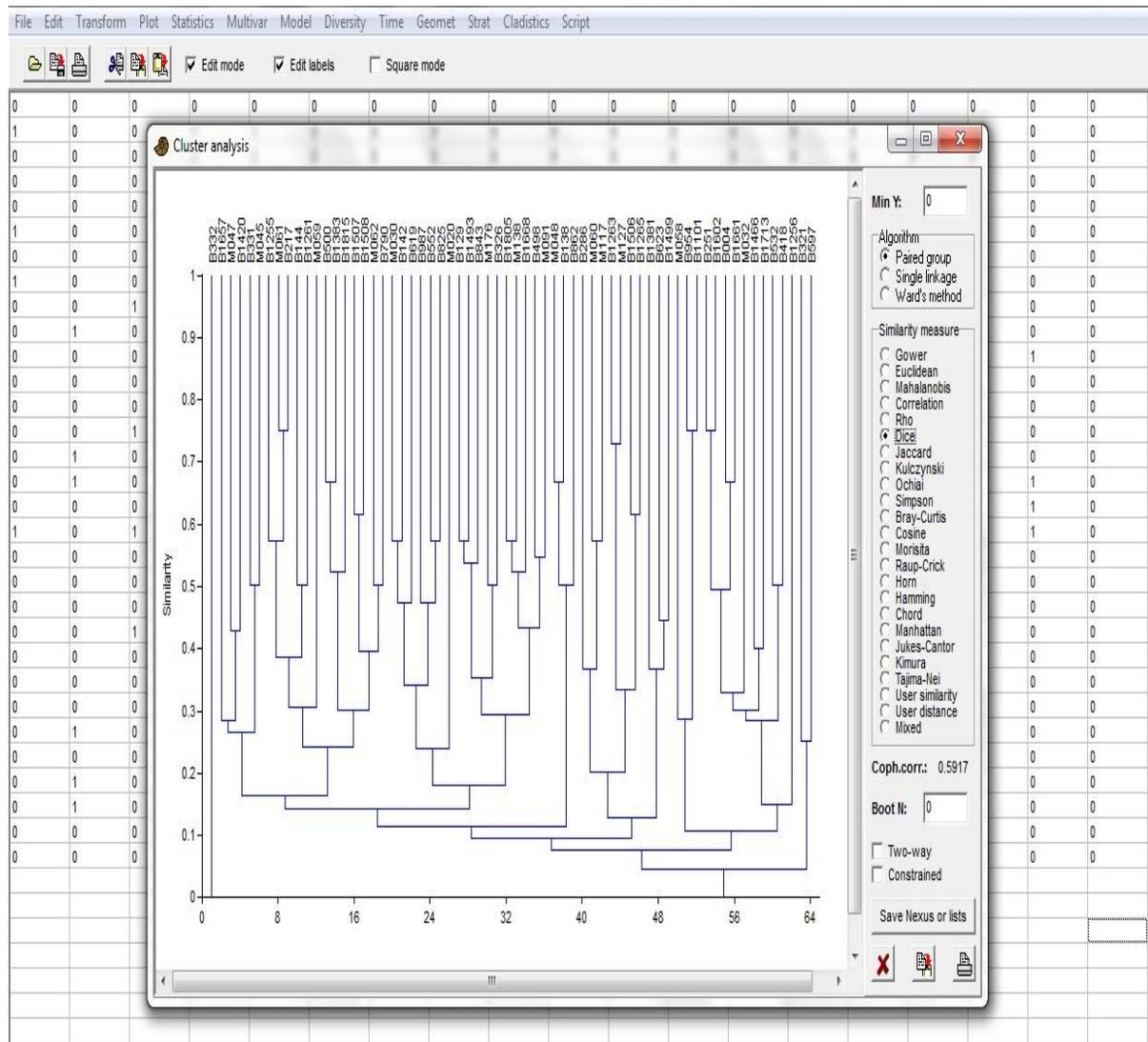


FIGURA 25. Obtención del Dendrograma