



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Análisis de la expresión genética del pili tipo 3 de
Klebsiella pneumoniae en aislados clínicos y su relación con la
formación de biopelículas”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

Jesús Ruíz Rosas

No. Cuenta: 306039085

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Miguel Ángel Ares Jiménez

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. José Oscar González Moreno

Ciudad de México, 2017.





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.



Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) de la Unidad de Medicina de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
2.2 Factores de virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	4
2.2.1 Los pilis de <i>K. pneumoniae</i>	7
2.2.2 El pili tipo 3 de <i>K. pneumoniae</i>	8
3. Planteamiento del problema	12
4. Hipótesis	12
5. Objetivos	13
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares	16
6. Material y Métodos	14
7. Resultados	24
8. Análisis de resultados	34
9. Conclusiones	37
10. Perspectivas	38
11. Referencias	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	5
Figura 2. Organización de los genes involucrados en la formación y en el ensamblaje del pili tipo 3 de <i>K. pneumoniae</i>	9
Figura 3. La maquinaria para la formación y el ensamblaje del pili tipo 3 de <i>K. pneumoniae</i>	10
Figura 4. Electroforesis del DNA genómico de <i>K. pneumoniae</i> 123/01	24
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos amplificados por PCR para los dos genes en estudio de <i>K. pneumoniae</i> .	25
Figura 6. Curvas de amplificación para los genes <i>rrsH</i> y <i>mrkA</i> de <i>K. pneumoniae</i> .	26
Figura 7. Linearización de las curvas de amplificación (curvas estándar).	27
Figura 8. Curvas de desnaturalización de los productos de amplificación de los genes en estudio de <i>K. pneumoniae</i>	28
Figura 9. PCR en tiempo real del gen <i>rrsH</i> en las muestras de RNA total de <i>K. pneumoniae</i>	30
Figura 10. Electroforesis del RNA total de las ocho cepas de <i>K. pneumoniae</i> .	30
Figura 11. Expresión del gen <i>mrkA</i> en las ocho cepas de <i>K. pneumoniae</i> aisladas de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial.	31
Figura 12. Evaluación de la formación de biopelículas en las ocho cepas clínicas de <i>K. pneumoniae</i> aisladas de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial.	32

1. INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae es considerado uno de los patógenos oportunistas más importantes; se asocia frecuentemente a infecciones del tracto urinario y a neumonía en personas sanas. Sin embargo, en personas inmunocomprometidas, puede ocasionar infección biliar, peritonitis, meningitis, septicemia y abscesos hepáticos. Además, es una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia de pacientes, tanto adultos como pediátricos, con infección nosocomial. Una de las características más importantes de *K. pneumoniae* es su alta resistencia a los antibióticos.

Los factores de virulencia de *K. pneumoniae* son el lipopolisacárido, las proteínas de membrana externa, los sideróforos, la cápsula y los pilis. De los pilis de dicho microorganismo, el pili tipo 3 es el más importante ya que es indispensable para la formación de biopelículas sobre superficies abióticas, tales como catéteres; los cuales pueden ser un foco para la infección y diseminación sistémica de la bacteria en pacientes inmunosuprimidos. No existen reportes acerca de la expresión del pili tipo 3 de *K. pneumoniae* en cepas clínicas y su relación directa con la capacidad para formar biopelículas, por lo tanto, la información generada en este trabajo contribuirá a entender los mecanismos de virulencia que puede esta bacteria utilizar para colonizar los catéteres y producir sepsis nosocomial.

El objetivo del presente estudio fue analizar la expresión del gen *mrkA*, el cual codifica para el componente estructural principal del pili tipo 3, en aislados clínicos de *K. pneumoniae* obtenidos de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial y su relación con la formación de biopelículas.

Para lo anterior, a partir de ocho aislados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial, obtenidos durante el mes de enero del 2015 en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI – IMSS, se realizaron cultivos a 37°C, en agitación constante en medio Luria Bertani (LB), hasta que el crecimiento bacteriano alcanzó la fase logarítmica.

El DNA genómico se extrajo para realizar una PCR punto final con la finalidad de amplificar el gen en estudio y observar los amplicones en un gel de agarosa al 1% posterior a una electroforesis. El RNA total se obtuvo de cada cultivo mediante la técnica de fenol ácido, se cuantificó la concentración y se determinó la pureza utilizando el NanoDrop-1000 de ThermoScientific. Además, se evaluó la integridad del RNA obtenido mediante el corrimiento electroforético en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes. El cDNA se obtuvo a partir del RNA utilizando los reactivos del Kit “Revertaid Firstrand” de ThermoScientific. Se analizó la expresión del gen *mrkA* en cada uno de los aislados clínicos, mediante PCR en tiempo real empleando el termociclador LyghtCycler 480 (Roche) y el sistema de detección del fluorocromo SYBR Green I.

Por otro lado, se evaluó la formación de biopelículas de cada una de las cepas mediante la inoculación en medio LB sobre pozos de placas de poliestireno, las biopelículas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% y se revelaron con una solución de etanol al 70%. La cantidad de cristal violeta adherida a la biopelícula se cuantificó mediante espectrofotometría en el lector Multiskan (Costar) determinando la densidad óptica a 600 nm.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no móvil y capsulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está presente de manera ubicua en el ambiente y es saprófito natural del tracto gastrointestinal y de la nasofaringe en humanos y animales (Podschun y Ullman, 1998).

K. pneumoniae es considerado uno de los patógenos oportunistas más importantes; se asocia frecuentemente a infecciones del tracto urinario y a neumonía en personas sanas (Meatherall y Gregson, 2009). Sin embargo, en personas inmunocomprometidas puede ocasionar infección biliar, peritonitis, meningitis, septicemia y abscesos hepáticos (Wu *et al.*, 2009). Además, es una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia de pacientes, tanto adultos como pediátricos, con infección nosocomial en diferentes regiones del mundo, incluyendo América Latina (Marra *et al.*, 2006; Tsering *et al.*, 2009; Ares *et al.*, 2013).

Una de las características más importantes de *K. pneumoniae* es su alta resistencia a los antibióticos, principalmente a los beta-lactámicos; esto debido principalmente a la producción de enzimas beta-lactamasas, las cuales hidrolizan a dichos antibióticos inhibiendo su actividad (Chong *et al.*, 2011).

En la última década se han detectado en todo el mundo cepas de *K. pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y de carbapenasas, lo que ha

originado un problema serio en el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo (Shields *et al.*, 2015).

La epidemiología de *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos varía entre hospitales y zonas geográficas. Algunos brotes son causados por cepas únicas y otros se deben aparentemente a casos por transferencia horizontal de plásmidos que pueden conferir resistencia a múltiples antimicrobianos (Manges *et al.*, 2015).

2.2 Factores de virulencia de *K. pneumoniae*

Al ser un microorganismo oportunista, *K. pneumoniae* sólo se convierte en patógeno cuando alcanza tejidos que normalmente son estériles o cuando afecta a pacientes inmunocomprometidos. Los principales factores implicados en la virulencia de *K. pneumoniae* son: el lipopolisacárido (LPS), los sideróforos, la cápsula de polisacárido y los pilis; todos ellos le permiten a la bacteria entrar y multiplicarse en el hospedero (Figura 1) (Balestrino *et al.*, 2008).

El LPS tiene actividad endotóxica debido al lípido A, que provoca la activación de los macrófagos e induce una respuesta inflamatoria con un efecto pirogénico. Por otro lado, las cadenas de polisacárido del antígeno O facilitan el proceso inicial de adherencia y confieren resistencia al microorganismo contra la actividad bactericida del suero (Podschun y Ullmann, 1998). En *K. pneumoniae* se han descrito nueve serotipos diferentes basados en el antígeno O: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12, de los cuales el serotipo O1 es el más frecuente en los aislados clínicos de *K. pneumoniae* (Hsieh *et al.*, 2015). Algunos estudios indican que la estructura del LPS

podría estar implicada en la virulencia de las bacterias Gram negativas incluyendo a *K. pneumoniae* ya que, de acuerdo a su variación en la composición química podría expresar diferentes antígenos de superficie (Putker *et al.*, 2015).

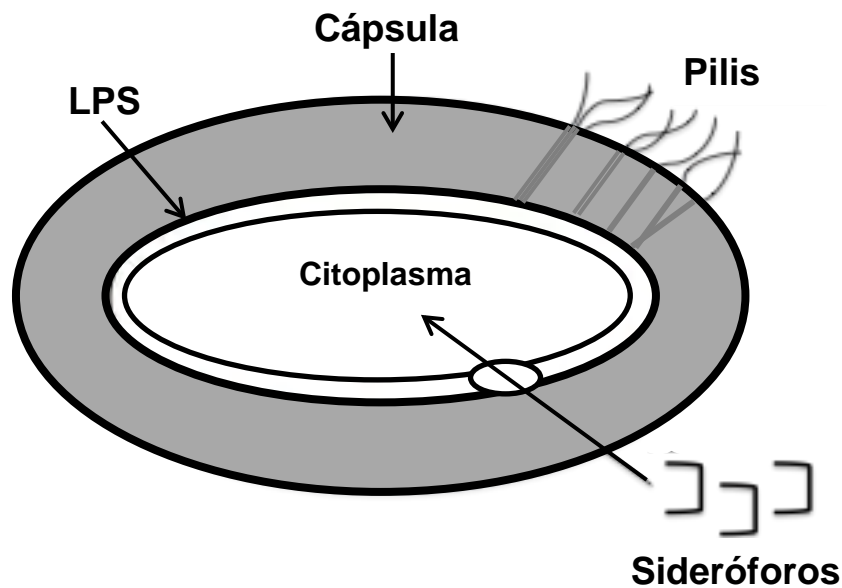


Figura 1. Factores de virulencia de *K. pneumoniae*. Se muestran los pilis, la cápsula, el lipopolisacárido (LPS) y los sideróforos, los cuales son considerados los principales factores de virulencia de este microorganismo. Adaptado de Podschun y Ullman, 1998.

Los sideróforos constituyen otro factor de virulencia en *K. pneumoniae* ya que son moléculas que permiten captar hierro bajo condiciones limitantes de dicho metal en el hospedero. El hierro es un factor esencial para el crecimiento bacteriano funcionando principalmente como catalizador de reacciones de óxido-reducción de proteínas que participan en transporte de electrones y oxígeno (Podschun y Ullman, 1998). La aerobactina, la enterobactina y la yersiniobactina son los sideróforos de mayor

importancia en esta bacteria, los cuales le proporcionan la capacidad para replicarse y mantener una infección local o sistémica (Russo *et al.*, 2015).

Las cepas de *K. pneumoniae* se caracterizan por poseer una cápsula de polisacárido, la cual está compuesta principalmente por glucosa, galactosa, fucosa, manosa, ramnosa y ácidos urónicos (Clements *et al.*, 2008). Esta cápsula es importante para la bacteria ya que le permite evadir al sistema inmunológico impidiendo la fagocitosis (Lee *et al.*, 2014).

La cápsula de *K. pneumoniae* le proporciona una alta resistencia a la desecación así como protección frente a la fagocitosis mediada por los polimorfonucleares y macrófagos (Nypaver *et al.*, 2010). Además, algunos estudios *in vitro* han demostrado que la cápsula de *K. pneumoniae* inhibe el depósito del componente C3 del complemento sobre la superficie de la bacteria reduciendo la formación del complejo de ataque a la membrana (Alvarez *et al.*, 2000; Cortes *et al.*, 2002).

La cápsula también le proporciona a *K. pneumoniae*, resistencia frente a la actividad de los péptidos antimicrobianos. Esto fue demostrado en un estudio, donde al crecer a la bacteria en un medio con bajas concentraciones de polimixina B, un péptido catiónico antimicrobiano, se sobre-expresaron algunos genes involucrados en la producción de la cápsula (Llobet *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que cuando se liberan componentes aniónicos de la cápsula de *K. pneumoniae*, estos atraen a los péptidos catiónicos antimicrobianos neutralizándolos y evitando así la muerte de la bacteria (Campos *et al.*, 2004).

2.2.1 Los pilis de *K. pneumoniae*

Los pilis o fimbrias son estructuras filamentosas no flagelares que permiten la adherencia de la bacteria sobre superficies bióticas y abióticas. Los principales pilis descritos en *K. pneumoniae* son: el pili tipo 1, el pili “*Escherichia coli* common pilus” (ECP) y el pili tipo 3. Diferentes estudios han demostrado que estos pilis son importantes para la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del tracto intestinal, del aparato urinario y del sistema respiratorio, mediante la unión a receptores específicos de superficie o a proteínas de la matriz extracelular. Además, se ha demostrado que el pili tipo 3 es indispensable para la formación de biopelículas sobre placas de poliestireno y catéteres (Struve *et al.*, 2009; Alcantar-Curiel *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2013).

El pili tipo 1 está presente en la mayoría de las enterobacterias, incluyendo a *K. pneumoniae*. Esta estructura que se extiende desde la superficie bacteriana es reconocida por receptores que contienen manosa, los cuales se encuentran presentes en la superficie de las células epiteliales. En *K. pneumoniae*, al igual que en *E. coli*, el pili tipo 1 está involucrado en la adherencia a las células del epitelio renal, considerándose un factor de virulencia indispensable para producir infección de vías urinarias. Sin embargo, se ha demostrado que el pili tipo 1 no es necesario para la formación de biopelículas sobre superficies abióticas (Struve *et al.*, 2009).

El pili ECP está presente en todos los patotipos y cepas comensales de *E. coli* y es considerado un factor indispensable para la formación de biopelículas sobre superficies abióticas y para la colonización de diferentes líneas celulares epiteliales

humanas y células vegetales *in vitro* (Rendón *et al.*, 2007; Garnett *et al.*, 2012; Saldaña *et al.*, 2014; Rosses *et al.*, 2014). En *K. pneumoniae* se ha reportado que este pili ECP también está presente y se ha demostrado mediante estudios de microscopía electrónica y de inmunofluorescencia que dicha estructura se expresa durante la formación de biopelículas y al contacto con células epiteliales HeLa (Alcantar-Curiel *et al.*, 2013).

2.2.2 El pili tipo 3 de *K. pneumoniae*

El pili tipo 3 fue inicialmente identificado en *K. pneumoniae* por Duguid y colaboradores (1959). Estos apéndices extracelulares miden de 0.5 a 2 μm de longitud y de 2 a 4 nm de ancho y se caracterizan por su capacidad para aglutinar *in vitro* a los eritrocitos previamente tratados con ácido tánico en presencia de manosa (Murphy y Clegg, 2012).

Los genes que codifican para el pili tipo 3 de *K. pneumoniae* están dispuestos en el cromosoma bacteriano en un operón constituido por 5 genes denominados *mrk*, del inglés “mannose resistant *Klebsiella*-like hemagglutination”. En la figura 2 se muestra la organización genética de dicho operón: el gen *mrkA* codifica para la pilina principal y mayoritaria, el gen *mrkB* codifica para una proteína chaperona de pilinas, el gen *mrkC* codifica para una proteína integral de la membrana externa denominada Usher, el gen *mrkD* codifica para una proteína que se localiza en el extremo final del pili, la cual funciona como adhesina y el gen *mrkF* codifica para una pilina minoritaria (Murphy y Clegg, 2012; Khater *et al.*, 2015).

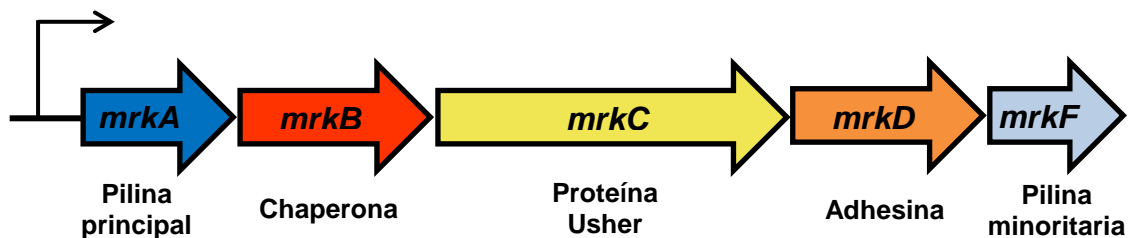


Figura 2. Organización de los genes involucrados en la formación y en el ensamblaje del pili tipo 3 de *K. pneumoniae*. Los genes están organizados en un operón de 5 genes. *mrkA* codifica para la pilina principal, *mrkB* codifica para una proteína chaperona de pilinas, *mrkC* codifica para una proteína integral de la membrana externa denominada Usher, *mrkD* codifica para una adhesina que se localiza en el extremo final del pili y *mrkF* codifica para una pilina minoritaria. Adaptado de Murphy y Clegg, 2012.

La secreción y el ensamblaje del pili tipo 3 en *K. pneumoniae* ha sido bien caracterizado (Figura 3). Las pilinas no necesitan un procesamiento post-traducciona; por lo tanto, recién sintetizadas son directamente secretadas hacia el espacio periplásmico a través del translocón SecYEG con la ayuda de la energía liberada por la ATPasa SecA (Ismail *et al.*, 2015). Una vez en el espacio periplásmico, las pilinas son reconocidas por la proteína chaperona MrkB formando un complejo chaperona-pilina que se dirige hacia la proteína Usher MrkC, la cual reconoce en su extremo amino terminal a dicho complejo y lo disocia, favoreciendo la unión de tipo no covalente entre las subunidades de pilina para la formación del pili tipo 3. Una vez ensamblado, el pili es secretado hacia el exterior atravesando el poro interno de la proteína MrkC (Huang *et al.*, 2009; Beckwith, 2013; Khater *et al.*, 2015).

El pili tipo 3 de *K. pneumoniae* juega un papel importante en su patogenicidad, de acuerdo a diversos estudios que han demostrado su relevancia en la adherencia a

células eucariotas y durante la formación de biopelículas (Langstraat *et al.*, 2001; Jagnow y Clegg, 2003; Di martino *et al.*, 2003; Alcantar-Curiel *et al.*, 2013).

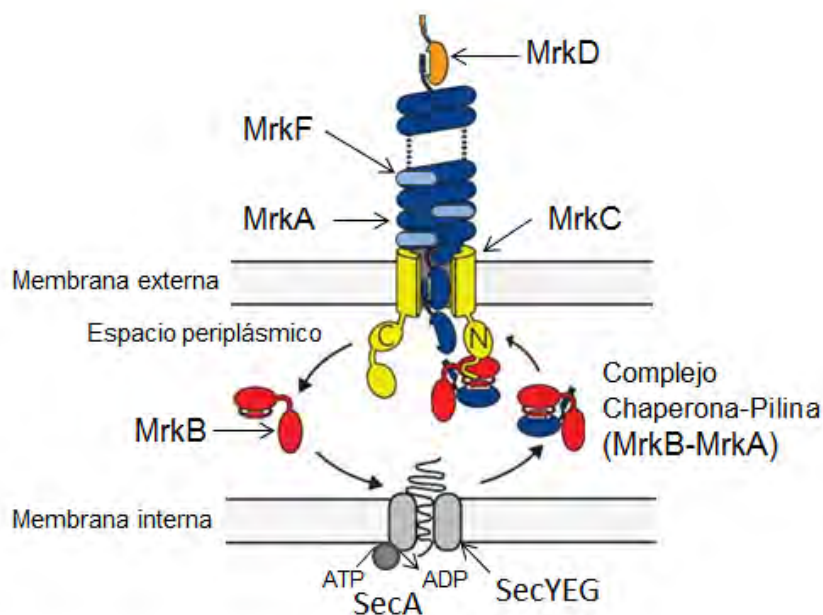


Figura 3. La maquinaria para la formación y el ensamblaje del pili tipo 3 de *K. pneumoniae*. El sistema de secreción del pili tipo 3 es de la clase “Chaperona-Usher”, el cual consta de la proteína chaperona de pilinas MrkB y de la proteína Usher MrkC, cuya función es actuar como translocón de la membrana externa para el correcto ensamblaje de las subunidades de pilina y posterior secreción del pili (ver texto para detalles). Adaptado de Thanassi *et al.*, 2012.

En un estudio, donde se generó una mutante en el gen *mrkC* de una cepa hipervirulenta de *K. pneumoniae*, se observó una disminución significativa en la formación del absceso hepático piógeno cuando se infectaron ratones por la vía oral, sugiriendo que al originar una deficiencia en el ensamblaje del pili tipo 3 se disminuyó la virulencia de dicho microorganismo (Tu *et al.*, 2009).

El pili tipo 3 de *K. pneumoniae* es un factor de virulencia involucrado en la colonización de catéteres siliconados implantados en vejigas de ratones, sugiriendo

que es necesario para la formación de biopelículas, las cuales son un foco de diseminación de dicha bacteria, que puede dar origen a las infecciones nosocomiales de vías urinarias (Murphy *et al.*, 2013).

El primer paso para la formación de las biopelículas es la adherencia de la bacteria sobre la superficie, la cual es facilitada en la mayoría de las enterobacterias por pilis y otras adhesinas no fimbriales de la superficie que dan lugar a interacciones bacteria-bacteria y bacteria-superficie. Las bacterias que encuentran la superficie conveniente, forman con ella una unión reversible mediada por atracciones electrostáticas o hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals (Dunee, 2002). Una vez adheridas, las bacterias comienzan a proliferar dando origen a la formación de microcolonias, las cuales una vez establecidas generan estructuras tridimensionales complejas mediante la producción de una matriz extracelular compuesta predominantemente de polisacáridos (Stewart y Costerton, 2001; Joo y Otto, 2012).

Diversos estudios han demostrado que el pili tipo 3 de *K. pneumoniae* está involucrado en la formación de biopelículas sobre superficies abióticas. Ya que cepas mutantes en el pili tipo 3 presentan un decremento importante en la formación de las mismas, sugiriendo que este pili está directamente involucrado en el desarrollo de este fenotipo (Schroll *et al.*, 2010).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Klebsiella pneumoniae es uno de los patógenos oportunistas de mayor relevancia a nivel mundial debido a su capacidad para producir infecciones nosocomiales; por lo tanto, el estudio de sus factores de virulencia como es el caso del pili tipo 3 ayudará a entender los mecanismos mediante los cuales esta bacteria coloniza los catéteres de los pacientes hospitalizados y su relación con la virulencia.

En la actualidad hay poca información sobre la expresión del pili tipo 3 de *K. pneumoniae* en aislados clínicos, el cual es uno de sus principales factores de virulencia debido a su importancia para la adherencia a las células epiteliales del hospedero y para la colonización sobre superficies abióticas, tales como catéteres de pacientes hospitalizados en donde dicha bacteria forma biopelículas. Con base en lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

- ¿Existe relación entre la expresión genética del pili tipo 3 y la formación de biopelículas en aislados clínicos de *K. pneumoniae*?

4. HIPÓTESIS

Ya que los pilis son factores de virulencia indispensables para la formación de biopelículas, entonces el gen *mrkA*, el cual codifica para la pilinia mayoritaria del pili tipo 3 de *K. pneumoniae*, aumentará su expresión en cepas que produzcan mayor biopelícula.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

5.2 Analizar la expresión genética del pili tipo 3 en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* obtenidos de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial y determinar si existe relación con la formación de biopelículas.

5.3 Objetivos específicos

- Cultivar *in vitro* cepas de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial obtenidos durante el mes de enero del 2015.
- Cuantificar mediante PCR en tiempo real la expresión del gen *mrkA* de *K. pneumoniae* en los diferentes aislados clínicos.
- Analizar la expresión del gen *mrkA* en las diferentes cepas de *K. pneumoniae* en estudio.
- Evaluar la formación de biopelículas en los diferentes aislados clínicos.
- Realizar un análisis comparativo entre la expresión del pili tipo 3 y la formación de biopelículas en los aislados clínicos de *K. pneumoniae* y la severidad del cuadro clínico de los pacientes.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Material**

Cepas bacterianas

Para este estudio se emplearon las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, aisladas previamente de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial durante el mes de enero de 2015 en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Las cepas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas. Las cepas se mantuvieron en glicerol al 20% a -70°C.

Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se realizarán en medio LB (DIFCO), que contiene 10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl.

- **Métodos**

Expresión del gen *mrkA* y diseño de sus iniciadores

El gen que se estudió en el presente trabajo fue *mrkA*, el cual codifica para la subunidad principal ó pilina mayoritaria del pili tipo 3. Como gen normalizador para el análisis de la expresión genética se utilizó el gen constitutivo *rrsH*, el cual codifica para el rRNA 16S.

La secuencia de la cepa de referencia *K. pneumoniae* NTUH-K2044 se tomó como base para el diseño de los iniciadores, los cuales se diseñaron utilizando el programa “Primer 3 plus”; dichos iniciadores se seleccionaron en base a los siguientes criterios: la Tm debió estar entre 58 y 62°C y debieron producir un amplicón de entre 100 y

200 pb. Una vez diseñados, los iniciadores se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA genómico se realizó de acuerdo a la metodología descrita por González-y-Merchand y colaboradores (1996). Para lo anterior, 10 mL de las cepas de *K. pneumoniae* en fase logarítmica se centrifugaron a 2500 x g durante 10 min; el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 2 mL de regulador de lisis (Cloruro de Guanidinio 6 M, Tween 80 al 10%, EDTA 0.5 M y 2-β-Mercaptoetanol 14.7 M).

Posteriormente, la suspensión se transfirió a tubos de 2 mL con tapón de rosca. Inmediatamente después se sometieron los tubos a tres ciclos de choque térmico, cada uno de 10 min a -70°C en un ultracongelador y 10 min a 65°C en un baño maría. Posteriormente, se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y las mezclas se agitaron suavemente en el vórtex y se centrifugaron a 16000 x g a temperatura ambiente durante 5 min.

La fase acuosa se recuperó y se le agregaron dos volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex para después proceder a centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones.

La fase acuosa se recuperó nuevamente y el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto; inmediatamente después se colocaron los tubos a una temperatura de -20°C durante 24 h para favorecer la precipitación. Los tubos se centrifugaron nuevamente durante 15 min a 16000 x g a temperatura ambiente,

posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 μ L de etanol al 70%, después se eliminó el exceso de etanol secando el DNA en el equipo "Eppendorf Speed Vac". La muestra se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada estéril dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida. El DNA se cuantificó por espectrofotometría utilizando el Nano Drop-1000 (ND-1000), se determinó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y finalmente se almacenó en el ultracongelador (Revco) a -70°C hasta su uso.

Amplificación de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.

Con el fin de confirmar que los iniciadores amplificaron el producto esperado se realizaron las PCR de punto final empleando las siguientes condiciones de la mezcla de reacción: 0.25 μ L que corresponde a 1U de Taq polimerasa (Invitrogen), 2.5 μ L de amortiguador de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH = 8.4; KCl 500 mM) (Invitrogen), 1.5 μ L de MgCl_2 a una concentración de 25 mM (Invitrogen), 0.5 μ L de dNTP's a una concentración de 10 mM (Invitrogen), 1.0 μ L de cada uno de los iniciadores a una concentración de 20 μ M (Invitrogen), 1.0 μ L de DNA genómico a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se llevó a un volumen final de 25 μ L adicionando 17.5 μ L de agua estéril libre de nucleasas.

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador Mastercycler® de Eppendorf; la amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5min, posteriormente 30 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 1 min, 72°C por 1 min y 57°C por 1 min, finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 10 min. Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante un corrimiento

electroforético a 80 V por 60 min en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.83 µg/mL), colocando en cada pozo 5 µL de producto de PCR y usando como regulador TAE 1X.

Elaboración de las curvas estándar para la PCR en tiempo real

Para poder cuantificar la expresión genética de las diferentes cepas en estudio, se realizaron las curvas estándar de concentración de DNA para el gen *mrkA* y para el gen normalizador *rrsH* con la finalidad de estandarizar las condiciones que se emplearon posteriormente en los experimentos de PCR en tiempo real.

Para este fin, se empleó DNA genómico de la cepa de referencia de *K. pneumoniae* 123/01, el cual previamente fue extraído y cuantificado en el NanoDrop-1000 (ThermoScientific).

A partir de una concentración inicial de 100 ng/µL de DNA genómico, se realizaron cuatro diluciones decimales seriadas hasta obtener 0.01 ng/µL. Las diferentes diluciones obtenidas, se utilizaron para obtener las curvas de amplificación mediante la PCR en tiempo real y estandarizar las condiciones de reacción para cada gen (*mrkA* y *rrsH*).

Para llevar a cabo la amplificación por PCR en tiempo real, se empleó el kit comercial para PCR en tiempo real LightCycler 480® SYBR Green I Master (Roche), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Con la mezcla de reacción se llenó cada pozo de una placa de 96 pozos para experimentos de PCR en tiempo real (Roche), dicha placa, se selló con una lámina

plástica adherente y se centrifugó a 1500 x g por 2 min. Posteriormente se colocó en el equipo LightCycler® 480 (Roche) aplicando posteriormente el programa que se describe a continuación: un ciclo a 95°C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95°C durante 10 s, temperatura de alineamiento de 57°C durante 10 s y 72°C durante 10 s (en este punto se realizó la medición de la fluorescencia), posteriormente un ciclo en las siguientes condiciones: 95°C durante 5 s a una velocidad de 4.4°C/s, 65°C durante 1 min a una velocidad de 2.2°C/s y 97°C durante 5 s (durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva de desnaturalización), y un ciclo final de enfriamiento a 40°C por 10 s.

Posteriormente, se generaron las curvas de amplificación graficando en el eje de las ordenadas la intensidad de la fluorescencia y en el eje de las abscisas el ciclo de PCR. Finalmente, se obtuvieron las rectas mediante el software del equipo, las cuales fueron las curvas estándar para cada gen en estudio.

A partir de las rectas obtenidas se determinó la eficiencia de la reacción mediante el coeficiente de correlación. Además, se construyeron las curvas de desnaturalización para los productos amplificados, las cuales dieron indicios de la especificidad de la amplificación de los genes.

Extracción del RNA total

La extracción del RNA se llevó a cabo de la siguiente manera:

Rompimiento celular: el cultivo de bacterias (10 mL) en fase logarítmica se centrifugó a 8000 x g durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla

obtenida se resuspendió en 500 μ L de solución de lisis (SDS 0.5%, Acetato de sodio 10 mM, EDTA 10 mM) y se colocaron en tubos con tapón de rosca de 2 mL.

Las bacterias se lisaron con vórtex de la siguiente manera: 3 ciclos de 1 min a velocidad máxima seguido de 1 min en incubación en hielo. Al lisado celular se añadieron 500 μ L de fenol ácido (Sigma) precalentado a 65°C y los tubos se agitaron vigorosamente y se incubarán a 65°C durante 5 min en thermoblock (Eppendorf). Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 16000 x g a 4°C por 5 min y se recuperaron 500 μ L del lisado celular en tubos limpios. A cada tubo se les agregaron 1000 μ L de etanol absoluto frío, dejando precipitar el RNA a -20°C toda la noche.

Precipitación del RNA: los tubos obtenidos en la fase anterior se centrifugaron a 16,000 x g durante 10 min a 4°C. El etanol se eliminó teniendo cuidado de no llevarse la pastilla obtenida y se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 16000 x g durante 5 min. El etanol se eliminó de la pastilla y se secó en el equipo "Eppendorf Speed Vac por 10 min. Se resuspendió en 100 μ L de agua DEPC para evitar degradación del RNA.

Purificación del RNA: a los tubos del paso anterior se les adicionaron 10 μ L de regulador para DNasa y 1 μ L de DNasa TURBO 10X (Ambion); posteriormente, se incubaron a 37°C durante 30 min.

Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionaron 10 μ L del Agente de Inactivación de la DNasa y se mezclaron suavemente; se incubaron a temperatura

ambiente durante 5 min y se centrifugaron a 8,000 xg durante 2 min. La fase acuosa que contenía al RNA se transferió a un tubo nuevo (100 µL).

Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras de RNA, se tomaron 2 µL de cada RNA total extraído, para emplearlo en una reacción de PCR en tiempo real empleando los iniciadores específicos para el gen del rRNA 16S de *K. pneumoniae* (KPN16SF: 5' TGCCTGATGGAGGGGGATAA 3' y KPN16R: 5' TTCACAACACGAGCTGACGA 3'); como control positivo de la PCR, se empleó el DNA genómico de la cepa de referencia *K. pneumoniae* 123/01.

En forma simultánea se estableció la concentración, pureza e integridad del RNA, en este caso; 1 µL de la muestra se cuantificó mediante el Nanodrop ND-1000 (Thermoscientific) obteniendo los valores de concentración y pureza de acuerdo al cociente de absorbancia A260/280 nm. Para la determinación de la integridad se analizó la cantidad correspondiente a 1 µg de RNA en un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturizantes con hipoclorito de sodio al 1%. Finalmente, el RNA se mantuvo a -70°C hasta su uso.

Obtención de cDNA mediante la transcripción reversa (RT) del RNA total

En todo momento se emplearon los reactivos del kit Thermoscientific; se procedió a realizar la mezcla de reacción, la cual contenía lo siguiente: 1 µg del RNA, 3 µL de iniciadores al azar (50 ng/µL), 1 µL de dNTP's (10mM) y agua DEPC a un volumen final de 10 µL. A esta mezcla se le adicionaron 2 µL de regulador RT 10X, 1 µL de RNasa Ribolock (40 U/µL) y 1 µL de la enzima Revertaid M-MuIV (50 U/µL).

Se llevó a cabo el siguiente ciclo de temperaturas en el termociclador Eppendorf: 25°C durante 10 min, 42°C durante 50 min, 70°C durante 15 min y 4°C de manera constante. Una vez terminado el proceso de retrotranscripción, los cDNA's obtenidos se almacenaron a – 70°C hasta su uso.

Amplificación de los genes mediante la PCR en tiempo real

Para la realización de la PCR en tiempo real, se empleó el termociclador LightCycler 480 (Roche); y el sistema de detección del fluorocromo SYBR® Green I.

Las reacciones para los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de plástico de 96 pozos especiales para el equipo Lightcycler®480 (Roche).

La mezcla de reacción para cada pozo consistió de:

- 1.5 µL de agua grado PCR contenida en el kit comercial.
- 1.0 µL de la mezcla de los iniciadores 20 µM.
- 5.0 µL de “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” 10X
- 2.5 µL de cDNA.

Cada reacción se realizó por triplicado.

Con la mezcla de reacción se llenó cada pozo de la placa, se selló con una lámina plástica adherente y se centrifugó a 1500 x g por 2 min. Posteriormente se colocó en el equipo LightCycler® 480 (Roche) aplicando posteriormente el programa que se describe a continuación: un ciclo a 95°C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95°C durante 10 s, temperatura de alineamiento de 57°C durante 10 s y 72°C durante 10 s (en este punto se realizó la medición de la fluorescencia),

posteriormente un ciclo en las siguientes condiciones: 95°C durante 5 s a una velocidad de 4.4°C/s, 65°C durante 1 min a una velocidad de 2.2°C/s y 97°C durante 5 s (durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva de desnaturalización), y un ciclo final de enfriamiento a 40°C por 10 s.

Determinación de la expresión genética relativa

El método descrito por Livack y Schmittgen (2001), se utilizó para determinar la expresión genética en unidades de expresión relativa mediante la aplicación de la fórmula matemática $2^{-\Delta CT}$. La ΔCT se determinó al restar el valor de CT (“crossing treshold”) del gen en estudio al valor de CT del gen rRNA 16S (*rrsH*) el cual es el gen normalizador. Los valores obtenidos se multiplicaron por un factor único en todos los resultados con la finalidad de que el resultado final fuera mayor o igual a 1.

Evaluación de la formación de biopelículas

La capacidad de formación de biopelículas fué evaluada con la metodología propuesta por Saldaña y colaboradores (2014). A partir de los cultivos en fase estacionaria se inocularon 10 μ L en 990 μ L de medio LB fresco.

Posteriormente, 200 μ L de la suspensión bacteriana se colocaron en un pozo de una placa de poliestireno (Costar) de 96 pozos; dicho procedimiento se realizó por quintuplicado para cada cepa.

Las placas se taparon e incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. Después del período de incubación, se removieron las células planctónicas con una micropipeta y se realizarán tres lavados con 200 μ L de PBS 1X. A continuación, se

adicionarán 100 μ L de cristal violeta al 1% y se dejó incubando a temperatura ambiente por 20 min.

Después, el cristal violeta se retiró y las células se lavaron de nuevo tres veces con 200 μ L de PBS 1X. Las biopelículas se dejaron secar y posteriormente fueron solubilizadas con 100 μ L de etanol al 70% por 5 min.

La cantidad de cristal violeta adherida a la biopelícula se cuantificó mediante espectrofotometría en el lector Multiskan (Costar) determinando la densidad óptica (DO) a 600 nm.

Análisis estadístico de los resultados

Con la finalidad de detectar diferencias significativas en la expresión genética y en la formación de biopelículas, de las diferentes cepas de *K. pneumoniae*, se efectuó un análisis paramétrico de varianza unifactorial (One Way ANOVA) y una comparación múltiple de Tukey empleando para ello el software estadístico GraphPad PRISM 5.0. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

Aislamiento de DNA genómico de *K. pneumoniae* 123/01

El DNA de la cepa de *K. pneumoniae* 123/01 obtenido presentó una calidad buena para la realización de los experimentos subsecuentes (Figura 4). Así mismo, se obtuvo una concentración de 1483.2 ng/ μ l y una pureza de 1.86 según el cociente de absorción A260/280nm.

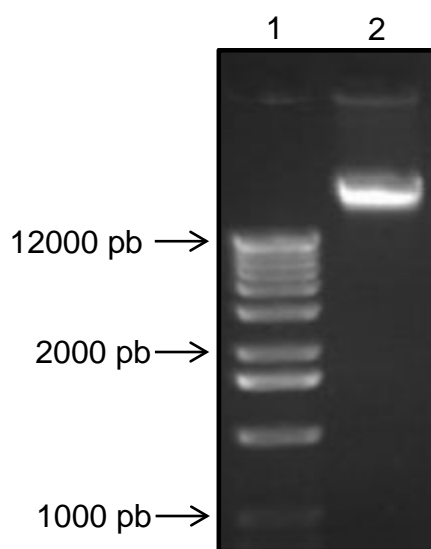


Figura 4. Electroforesis del DNA genómico de *K. pneumoniae* 123/01. Carril 1, Marcador de tamaño molecular de 1 kb; carril 2, DNA genómico obtenido de *K. pneumoniae* 123/01.

Genes candidatos y diseño de sus iniciadores

De los dos genes seleccionados (*rrsH* y *mrkA*) se diseñaron los pares de iniciadores empleando el programa bioinformático primer 3 plus con base en la cepa de *K. pneumoniae* NTUH-K2044, cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado y anotado en la página del “Centro Nacional de Información Biotecnológica” (NCBI: por sus siglas en inglés).

En la tabla 1 se muestra la secuencia de los iniciadores seleccionados así como el tamaño de los amplicones. Los iniciadores se probaron por PCR convencional empleando DNA genómico de la cepa de *K. pneumoniae* 123/01; de esta forma se comprobó que los iniciadores sí amplificaban los fragmentos de los tamaños esperados para cada uno de los genes empleados en este estudio (Figura 5).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos y tamaño de los amplicones para los dos genes de *K. pneumoniae* en estudio.

Gen	Secuencia del iniciador (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>rrsH</i>	F: TGATCTGGCTTCGTTAGAACC R: GTCCACCACCCTGCACTACC	103
<i>mrkH</i>	F: AGGTGCGCTGTATCGACGAA R: ACAGTGGCGACCACAACTC	116

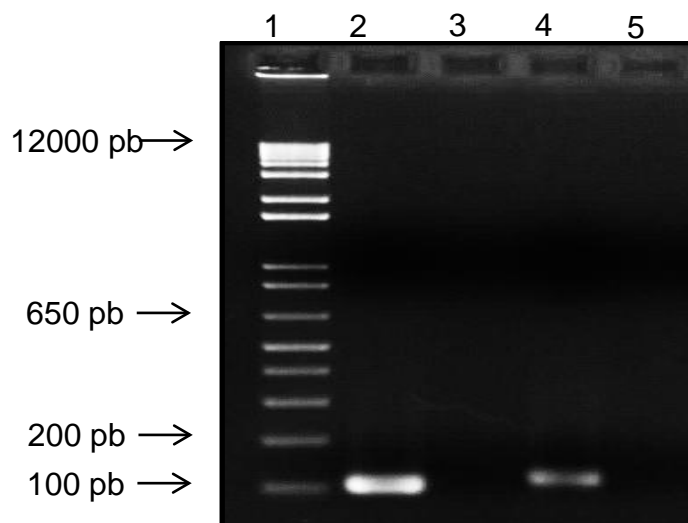


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos amplificados por PCR para los dos genes en estudio de *K. pneumoniae* 123/01. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 Kb plus Invitrogen®; carriles 3 y 5 control negativo de cada gen al usar como molde en la reacción de PCR agua MilliQ estéril; carril 2, amplicón correspondiente al gen *rrsH*; carril 4, amplicón correspondiente al gen *galF*.

Construcción de las curvas estándar.

Los DNA's genómicos diluidos desde 100 ng/μL hasta 0.001 ng/μL se amplificaron mediante PCR en tiempo real, para los dos genes estudiados. Posteriormente, se construyeron las curvas de amplificación graficando en el eje de las "y" la intensidad de fluorescencia y en el eje de las "x" el ciclo de PCR (Figura 6); en esta figura se muestra que a mayor concentración de DNA, la fluorescencia debida a la amplificación se detectó en un menor número de ciclos de la PCR. Por ejemplo, para el gen *rrsH* (rRNA 16S), la fluorescencia comenzó a detectarse después del ciclo 10 cuando la muestra contaba con 100 ng/μL de DNA; mientras que para 10 ng/μL, la fluorescencia se detectó justo después del ciclo 15 y para 1 ng/μL hasta el ciclo 20 y así sucesivamente.

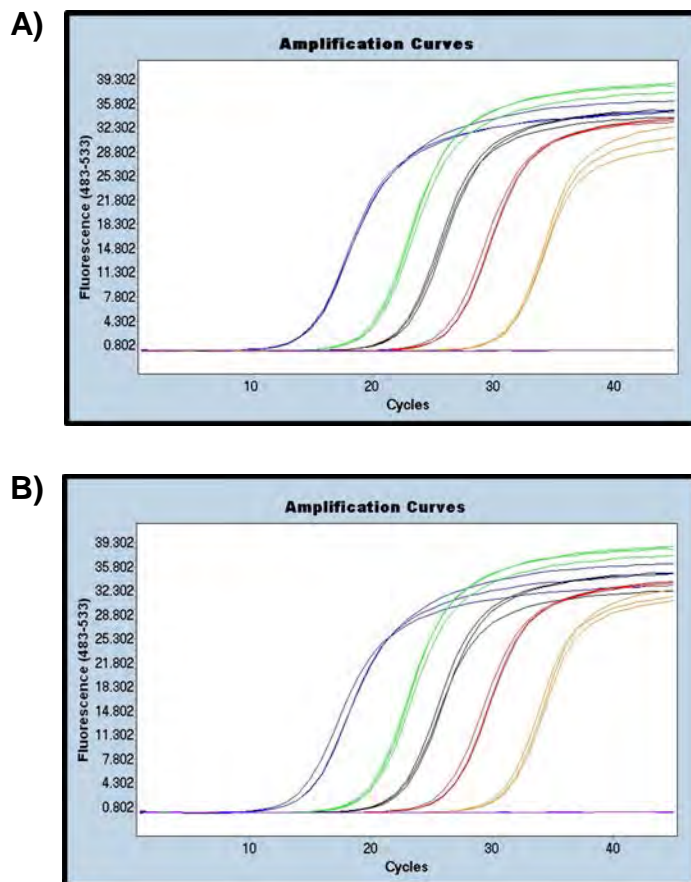
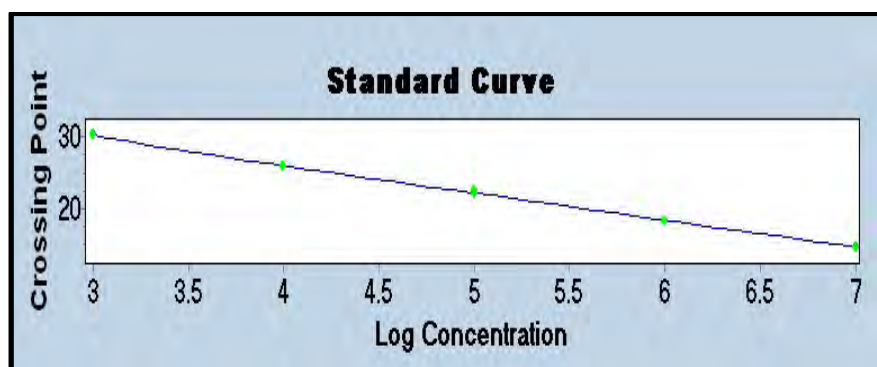


Figura 6. Curvas de amplificación para los genes *rrsH* y *mrkA* de *K. pneumoniae*. Todas las curvas se realizaron por triplicado. Cada gráfica presenta cinco curvas de izquierda a derecha que contienen 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng/μL de DNA, respectivamente. A) Curvas de amplificación correspondientes al gen *rrsH*. B) Curvas de amplificación correspondientes al gen *mrkA*.

Las curvas estándar se generaron automáticamente por el software del equipo termociclador de PCR en tiempo real Light Cycler 480® de Roche mediante la fórmula de la recta (Figura 7). En cada una de las curvas se determinó la eficiencia de reacción, las cuales resultaron en 1.98 y 1.92 para los genes *rrsH* y *mrkA*, respectivamente. Estos resultados indicaron que las condiciones establecidas para las reacciones de PCR en tiempo real eran adecuadas para analizar posteriormente la expresión de los genes en estudio.

A)



B)

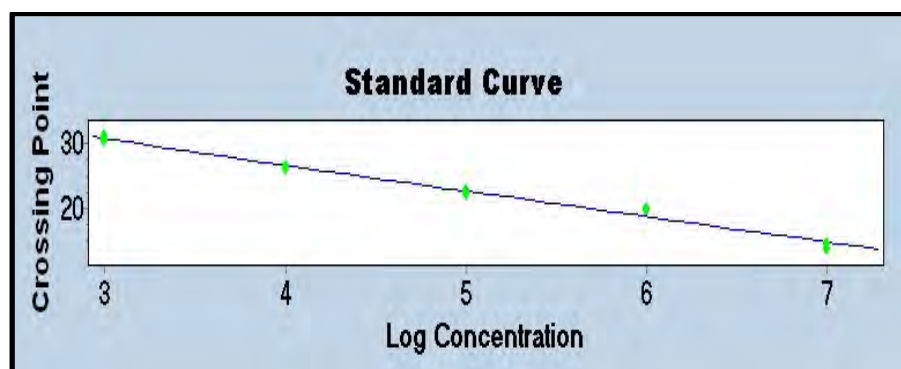
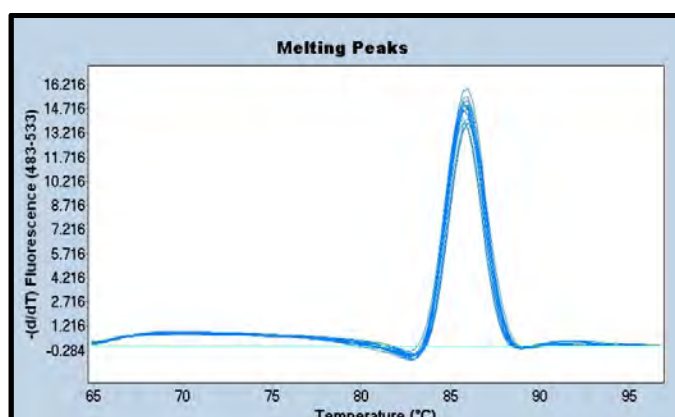


Figura 7. Linearización de las curvas de amplificación (curvas estándar). A) Curva estándar correspondiente al gen *rrsH*. B) Curva estándar correspondiente al gen *mrkA*.

Así mismo, se demostró mediante análisis del producto de PCR por curva de desnaturalización, que no se presentaron productos inespecíficos en la reacción (Figura 8), ya que en cada una de las gráficas para los dos genes (*rrsH* y *galF*), solo se presentó un pico o producto de desnaturalización, indicativo de que durante la PCR cuantitativa solo se generó el amplicón correspondiente para el cual los iniciadores fueron diseñados.

A)



B)

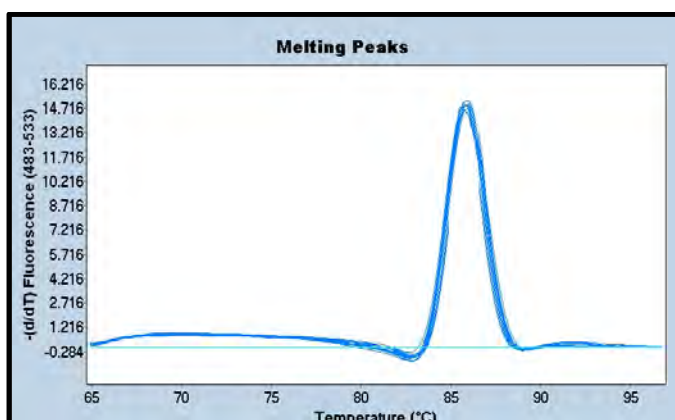


Figura 8. Curvas de desnaturalización de los productos de amplificación de los genes en estudio de *K. pneumoniae*. A) Curva de desnaturalización correspondiente al gen *rrsH*. B) Curva de desnaturalización del gen *mrkA*. En ambas curvas se observa un solo pico alrededor de 85°C, lo que indica que las reacciones de PCR en tiempo real son específicas para cada gen en estudio.

Extracción de RNA de las cepas clínicas de *K. pneumoniae*

Se realizó la obtención del RNA total a partir de las ocho cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial. Al cuantificar en el Nanodrop 1000 el RNA total aislado de las ocho cepas se obtuvieron concentraciones entre 836.6 y 1197.4 ng/ μ L y purezas de 2.02 a 2.18 según el cociente de absorción A260/280 nm (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación del RNA total aislado de las cepas de *K. pneumoniae*.

Cepa	Concentración de RNA (ng/ μ L)	Cociente A260/280 nm
1	1778.6	2.02
2	1618.8	2.15
3	1661.4	2.18
4	836.6	2.11
5	946.6	2.17
6	885.2	2.05
7	1197.4	2.14
8	1003.4	2.09

Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras de RNA total, se realizó una PCR en tiempo real empleando iniciadores específicos para el gen constitutivo *rrsH* que codifica para el RNA ribosomal 16S de *K. pneumoniae*, como control positivo de la reacción; se empleó DNA genómico a una concentración de 100 ng/ μ L. No se detectó amplificado alguno en las ocho muestras, por lo tanto el RNA total se encontró libre de DNA (Figura 9).

La integridad del RNA se comprobó mediante el análisis de 1 μ g de cada muestra de RNA empleando un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes con hipoclorito de sodio al 1%. La integridad del RNA fue adecuada en todos los casos para continuar con los experimentos ya que las bandas correspondientes al rRNA 23S y rRNA 16S se observaron con una calidad óptima (Figura 10).

A)

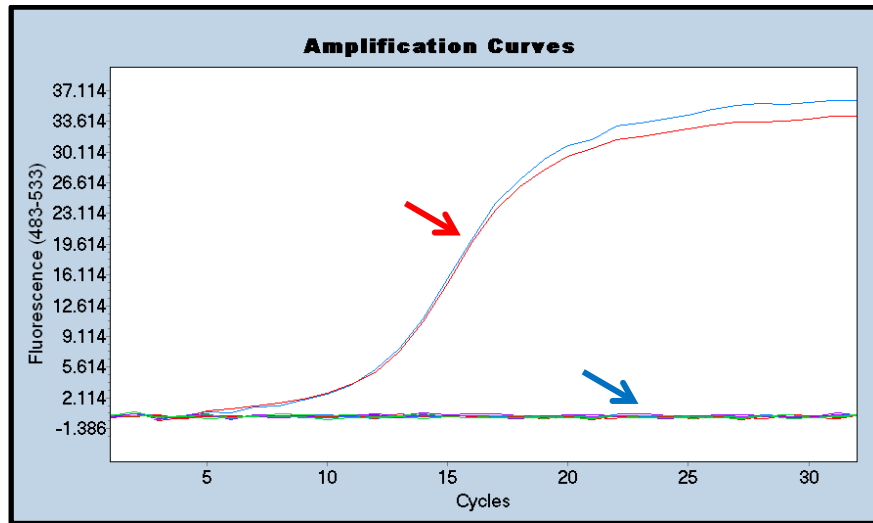


Figura 9. PCR en tiempo real del gen *rrsH* en las muestras de RNA total de *K. pneumoniae*. Se observan las curvas de amplificación. En el eje de las "Y" se indica la fluorescencia y en el de las "X" el ciclo de PCR. La flecha roja indica la fluorescencia del DNA genómico de *K. pneumoniae* 123/01 (usado como control positivo: 100 ng/ μ L, por duplicado). La flecha azul indica la no fluorescencia de las ocho muestras de RNA total obtenido de las cepas de *K. pneumoniae* en estudio.

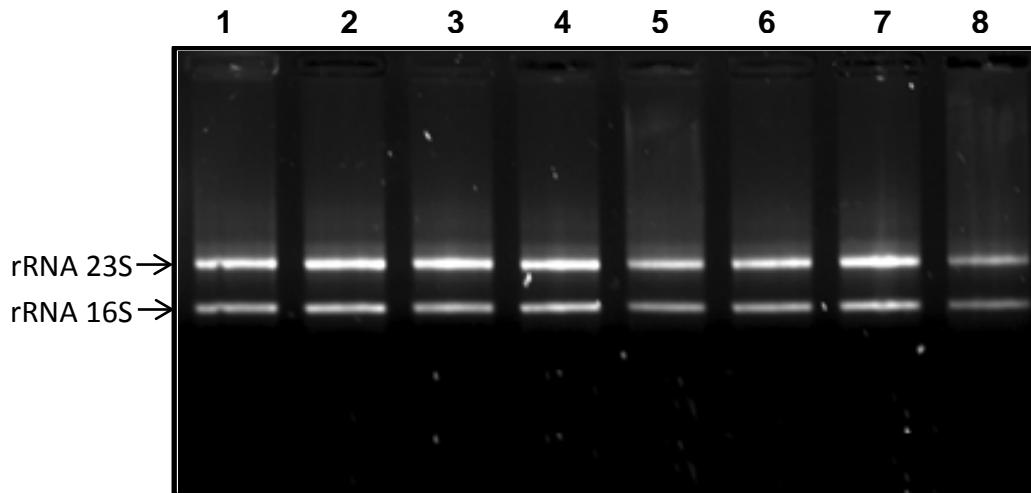


Figura 10. Electroforesis del RNA total de las ocho cepas de *K. pneumoniae*. Se utilizó un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes con hipoclorito de sodio al 1%. El RNA total fue obtenido a partir de cultivos *in vitro* en medio LB en fase logarítmica de crecimiento de las ocho cepas de *K. pneumoniae* estudiadas. Las bandas correspondientes al rRNA 23S y al rRNA 16S se observan de manera nítida indicando una integridad adecuada.

Expresión genética relativa de las ocho cepas de *K. pneumoniae*

Los valores de expresión genética relativa del gen *mrkA* para los ocho aislados clínicos de *K. pneumoniae*, los cuales fueron obtenidos mediante la fórmula $2^{-\Delta CT}$. El valor de ΔCT se determinó al restar el valor de CT del gen *mrkA* del valor de CT del gen normalizador *rrsH* (16S rRNA) para cada cepa en estudio, el resultado final se multiplicó por 1000, con la finalidad de obtener en todos los casos valores por arriba de la unidad. En todos los casos los valores de CT fueron menores a 30, por lo cual se consideraron como resultados de expresión genética positiva. Los resultados se expresan en unidades de expresión relativa y se muestran en la Figura 11.

Las cepas 2, 3 y 8 fueron las que mostraron los niveles más altos de expresión genética relativa del gen *mrkA*, seguidas por las cepas 4, 5 y 6. Las cepas 1 y 7 presentaron los niveles menores de expresión del gen *mrkA* (Figura 11).

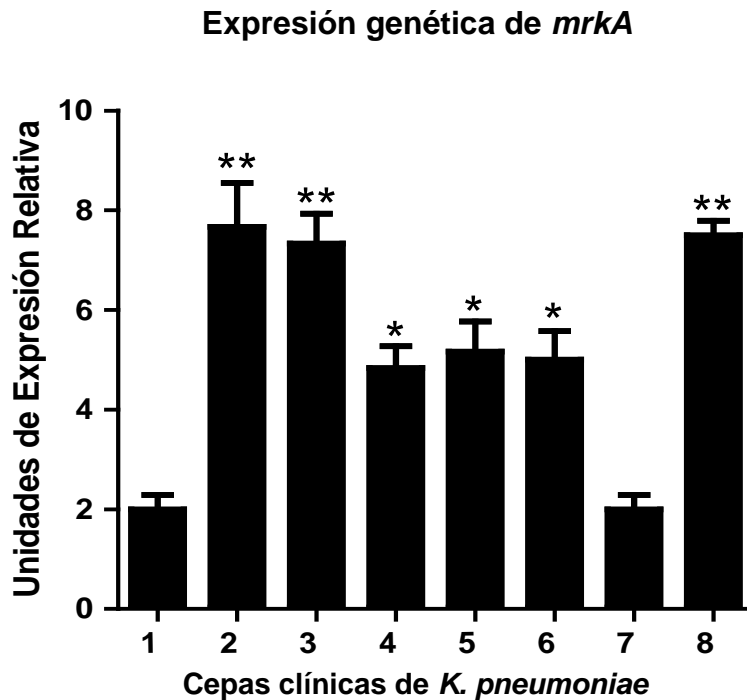
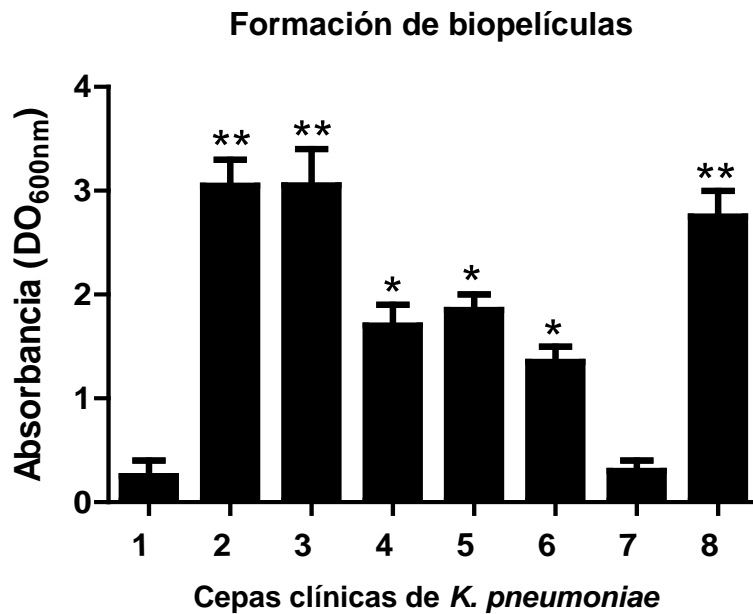


Figura 11. Expresión del gen *mrkA* en las ocho cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial. Resultados de expresión genética relativa de *mrkA*. Las cepas 2, 3 y 8 muestran los valores más altos de expresión genética, seguidas de las cepas 4, 5 y 6. Las cepas 1 y 7 presentan los niveles más bajos de expresión genética. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ de acuerdo a la prueba estadística One way ANOVA y comparación múltiple de Tukey con respecto a la cepa 1, la cual produjo menos biopelícula.

Evaluación de la formación de biopelículas

Al comparar los resultados de la formación de biopelículas entre los ocho aislados clínicos de *K. pneumoniae*, interesantemente, estos concordaron con los previamente observados en la expresión genética al observarse también que las cepas 2, 3 y 8 presentaron los más altos niveles de formación de biopelícula. Las cepas 4, 5 y 6 presentaron niveles intermedios, mientras que las cepas 1 y 7 presentaron los niveles de formación de biopelícula más bajos (Figura 12).

A)



B)

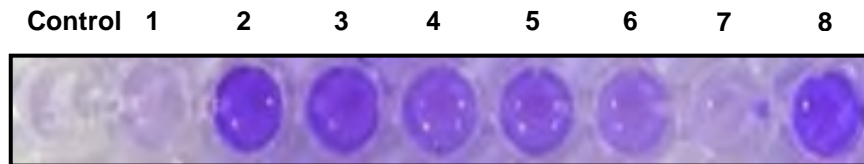


Figura 12. Evaluación de la formación de biopelículas en las ocho cepas clínicas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos con sepsis nosocomial. A) Resultados de la cuantificación de las biopelículas al solubilizar el cristal violeta retenido con etanol al 70%. Los valores están expresados en unidades de absorbancia a una DO de 600 nm. B) Observación macroscópica de las biopelículas teñidas con cristal violeta de las ocho cepas en estudio. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ de acuerdo a la prueba estadística One way ANOVA y comparación múltiple de Tukey con respecto a la cepa 1, la cual produjo menos biopelícula.

Relación entre la expresión genética de *mrkA*, la formación de biopelículas y la severidad del cuadro clínico de los pacientes.

La relación entre la sobre-expresión del gen *mrkA* y la formación de biopelículas con la severidad del cuadro clínico de los pacientes pediátricos con sepsis nosocomial se muestra en la tabla 3.

Los resultados indican que las cepas 1, 5, 6 y 8 fueron aisladas de pacientes donde se desencadenó choque séptico. Los resultados indican que no existe una relación evidente entre la sobre-expresión genética del pili tipo 3, la formación de biopelículas y la gravedad del cuadro clínico del paciente como lo es el choque séptico lo que podría indicar que podrían existir otros factores que pueden desencadenar tal complicación de la sepsis nosocomial, tales como el estado inmunológico debilitado de los pacientes.

Tabla 3. Relación de la sobre-expresión de la cápsula de *K. pneumoniae* y la complicación de choque séptico en los ocho pacientes pediátricos con sepsis nosocomial.

Paciente (sexo)	Edad (años)	Expresión del gen <i>mrkA</i> *	Formación de biopelícula	Patología inicial	Choque séptico
1 (F)	5	2.13	Baja	LLA	SI
2 (F)	10	7.85	Alta	LH	NO
3 (M)	6	7.72	Alta	LLA	NO
4 (F)	RN	4.46	Intermedia	HC	NO
5 (M)	8	4.51	Intermedia	LLA	SI
6 (M)	6	4.49	Intermedia	FQ	SI
7 (M)	10	2.24	Baja	OS	NO
8 (F)	6	7.78	Alta	LLA	SI

F: Femenino, M: Masculino, RN: Recién nacido, LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda, LH: Linfoma de Hodgkin, HC: Hidrocefalia, FQ: Fibrosis Quística, OS: Osteosarcoma. *Unidades de expresión relativa.

8. Análisis de resultados

En la actualidad, *K. pneumoniae* ha tomado importancia en el área de la bacteriología médica y la infectología ya que se han reportado brotes epidemiológicos de cepas resistentes a múltiples antibióticos por lo cual el tratamiento empírico de las sepsis nosocomiales la mayoría de las veces falla y origina complicaciones como el choque séptico y la falla multiorgánica que pueden ambas conducir a la muerte del paciente.

El estudio de los factores de virulencia desde el punto de vista genético mediante las herramientas de biología molecular, hoy en día son de gran utilidad ya que permiten investigar los factores de riesgo que pueden originar complicaciones en los pacientes infectados con este patógeno oportunista.

En este estudio, se analizó la expresión genética del pili tipo 3 midiendo la expresión relativa del gen *mrkA*, el cual codifica para la pilina mayoritaria del pili tipo 3. Se analizaron los niveles de expresión genética relativa de *mrkA* en ocho aislados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes que presentaron sepsis nosocomial durante el mes de enero del 2015 en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social y además se determinó el nivel de biopelículas formado por estas cepas y finalmente se realizó una relación entre los aislados clínicos y la complicación de la sepsis nosocomial más común: el choque séptico.

Los pilis o fimbrias de las bacterias son relevantes para la adherencia a las células del hospedero así como para la formación de biopelículas sobre superficies bióticas y abióticas. En el presente estudio, se encontró un incremento significativamente mayor en la expresión del gen fimbrial *mrkA*, en tres de los ocho aislados clínicos analizados. En contraste, los niveles de expresión del gen *mrkA* en dos cepas fueron considerablemente menores. Tres cepas presentaron niveles intermedios de expresión genética de *mrkA*.

En cuanto a la formación de biopelículas los resultados correlacionaron con lo observado en la expresión genética de *mrkA*, por lo cual este estudio pone en evidencia que existe una relación directa entre la expresión genética del pili tipo 3 y el fenotipo de formación de biopelículas.

Con respecto a la relación entre la expresión del gen *mrkA*, la formación de biopelículas y la manifestación de choque séptico en los pacientes, de los cuales se aislaron las cepas analizadas, no hubo evidencia alguna de la asociación entre la posible hipervirulencia de las cepas por la capacidad de formar biopelículas y la severidad de los cuadros clínicos de los pacientes.

Interesantemente, de las tres cepas hiperproductoras de biopelícula (cepas 2, 3 y 8), solo una fue aislada de un paciente que en ese momento presentaba choque séptico; estos hallazgos podrían indicar que la infección debida a esa cepa hiperproductora de biopelícula estuviera asociada con la severidad y/o complicación del cuadro clínico, tal como lo es el choque séptico. Sin embargo, las otras dos cepas hiperproductoras de biopelícula se aislaron de pacientes que no manifestaron complicación alguna de la sepsis nosocomial. Además, una de las cepas aisladas (cepa 1); la cual produjo bajos niveles de biopelícula, también fue aislada de un paciente con choque séptico, lo que podría sugerir que a pesar de que la cepa no presentó una posible hipervirulencia asociada a la sobre-expresión del gen *mrkA* (pili tipo 3), el paciente desarrolló choque séptico debido a su estado inmunológico deprimido ya que tenía Leucemia linfoblástica aguda como patología inicial, enfermedad crónica conocida por abatir dramáticamente el estado inmunológico de los pacientes (Tabla 3).

El 75% de los pacientes con sepsis nosocomial presentó una patología hemato-oncológica y los tres pacientes de los cuales se aislaron las cepas hiperproductoras de biopelícula presentaron como patología inicial Leucemia Linfoblástica Aguda, enfermedad que se ha relacionado en diversos estudios con la susceptibilidad a complicarse con sepsis nosocomial ya que los tratamientos quimioterapéuticos en estos pacientes son invasivos y requieren de la colocación de catéteres que son

altamente susceptibles a la contaminación por microorganismos que pueden diseminarse al torrente sanguíneo y establecerse en múltiples órganos y tejidos.

Varios estudios han puesto en evidencia que la presencia de un patógeno más virulento puede desencadenar un choque séptico; una complicación de la sepsis nosocomial, sin embargo, es importante mencionar que son varios los factores que pueden desencadenar el choque séptico como complicación de la sepsis nosocomial, tales como: la patología inicial de los pacientes, los procedimientos invasivos, la higiene de las áreas hospitalarias y del personal que manipula a los pacientes, así como la virulencia de los patógenos y la resistencia a los antibióticos de los mismos.

Para obtener datos más alentadores acerca de la relación de la virulencia asociada con los altos niveles de expresión genética del pili tipo 3 y las complicaciones en los pacientes pediátricos con sepsis nosocomial se requieren de estudios con un mayor número de muestras y con otros experimentos, tales como evaluación de la adherencia a células epiteliales de pulmón y a macrófagos *in vitro*.

Los datos generados en este trabajo amplían nuestra perspectiva acerca del papel relevante del pili tipo 3 en la virulencia de *K. pneumoniae*. Experimentos futuros mostrarán con más detalle el papel del pili tipo 3 en la patogénesis de este microorganismo y su asociación con las complicaciones derivadas de tal patología.

9. CONCLUSIONES

- La expresión del gen *mrkA* fue mayor en tres de las ocho cepas analizadas.
- La formación de biopelículas correlacionó con la expresión genética de *mrkA*.
- No hubo asociación ente la expresión del gen *mrkA*, la formación de biopelículas y la severidad del cuadro clínico de los pacientes, de los cuales se aislaron dichas cepas estudiadas.

10. PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión del gen *mrkA* de los aislados clínicos al contacto con células epiteliales y macrófagos.
- Realizar ensayos de adherencia con células epiteliales y macrófagos y correlacionar los resultados con la formación de biopelículas.
- Evaluar la expresión genética de otros factores de virulencia, tales como la cápsula, el lipopolisacárido y los sideróforos en estos aislados clínicos de *K. pneumoniae*.

11. REFERENCIAS

- Adegbola RA, Old DC. Fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter aerogenes*. J Med Microbiol. 1985. 19:35-43.
- Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine NM, De la Cruz MA, Girón JA. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. Virulence. 2013. 15: 129-138.
- Alvarez O, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, Alberti S: Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. Infect Immun. 2000. 68: 953-955.
- Ares MÁ, Alcántar-Curiel MD, Jiménez-Galicia C, Rios-Sarabia N, Pacheco S, De la Cruz MÁ. Antibiotic resistance of gram-negative bacilli isolated from pediatric patients with nosocomial bloodstream infections in a Mexican tertiary care hospital. Chemotherapy. 2013. 59: 361-368.
- Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagensen JA, Forestier C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. Environ Microbiol. 2008. 10: 685-701.
- Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Infect Genet Evol. 2011. 11: 1409-1504.
- Clements A, Gaboriaud F, Duval JF, Farn JL, Jenney AW, Lithgow T, Wijburg OL, Hartland EL, Strugnell RA. The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. PLoS One. 2008. 3: e3817.
- Cortes G, Alvarez O, Saus C, Alberti S: Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. Infect Immun. 2002. 70: 1075-1080.
- D'Andrea MM, Amisano F, Giani T, Conte V, Ciacci N, Ambretti S, Santoriello L, Rossolini GM. Diversity of capsular polysaccharide gene clusters in Kpc-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates of sequence type 258 involved in the Italian epidemic. PLoS One. 2014. 9: e96827.

- Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. Res Microbiol. 2003. 154: 9-16.
- Duguid JP. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. J Gen Microbiol 1959. 21: 271-286.
- Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev. 2002.15: 155-156.
- Garnett JA, Martínez-Santos VI, Saldaña Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, Simpson PJ, Cota E, Puente JL, Girón JA, Matthews S. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. 109: 3950-3955.
- González-y-Merchand J.A., Estrada-García I., Colston M.J. Cox R.A. A novel method for isolation of mycobacterial DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996. 135: 71-77.
- Hogley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. FEMS Microbiol Rev. 2015.39: 649-669.
- Hsieh PF, Wu MC, Yang FL, Chen CT, Lou TC, Chen YY, Wu SH, Sheu JC, Wang JT. D-galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in *Klebsiella pneumoniae*: implication in vaccine design. Front Microbiol. 2014. 5: e608.
- Huang YJ, Liao HW, Wu CC, Peng HL. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. Res Microbiol. 2009. 160: 71-79.
- Ismail N, Hedman R, Lindén M, von Heijne G. Charge-driven dynamics of nascent-chain movement through the SecYEG translocon. Nat Struct Mol Biol. 2015. 22: 145-149.
- Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology. 2003. 149: 2397-2405.
- Joo HS, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chem Biol. 2012. 19: 1503-1513.

- Khater F, Balestrino D, Charbonnel N, Dufayard JF, Brisse S, Forestier C. *In silico* analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. PLoS One. 2015.
- Khater F, Balestrino D, Charbonnel N, Dufayard JF, Brisse S, Forestier C. *In silico* analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. PLoS One. 2015. 10: e0116215.
- Kim EA, Blair DF. Function of the Histone-Like Protein H-NS in Motility of *Escherichia coli*: Multiple Regulatory Roles Rather than a Direct Action at the Flagellar Motor. J Bacteriol. 2015. 197: 3110-3120.
- Landick R, Wade JT, Grainger DC. H-NS and RNA polymerase: a love-hate relationship? Curr Opin Microbiol. 2015. 24: 53-59.
- Lang B, Blot N, Bouffartigues E, Buckle M, Geertz M, Gualerzi CO, Mavathur R, Muskhelishvili G, Pon CL, Rimsky S, Stella S, Babu MM, Travers A. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. Nucleic Acids Res. 2007. 35: 6330-6337.
- Langstraat J, Bohse M, Clegg S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. Infect Immun. 2001. 69: 5805-5812.
- Lee CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. Virulence. 2014. 5: 673-679.
- Lin TL, Yang FL, Yang AS, Peng HP, Li TL, Tsai MD, et al. Amino acid substitutions of MagA in *Klebsiella pneumoniae* affect the biosynthesis of the capsular polysaccharide. PLoS one. 2012. 7: e46783.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001. 25: 402-408.
- Llobet E, Campos MA, Gimenez P, Moranta O, Bengoechea JA: Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. Infect Immun. 2011. 79: 3718-3732.

- Manges AR. Genomic Epidemiology: Revealing Hidden Reservoirs for *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis. 2015. 61: 900-902.
- Marra AR, Wey SB, Castelo A, Gales AC, Cal RG, Filho JR, Edmond MB, Pereira CA. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. BMC Infect Dis. 2006. 6: e24.
- Martínez LC, Vadyvaloo V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. Front Cell Infect Microbiol. 2014. 4: e38.
- Martínez-Santos VI, Medrano-López A, Saldaña Z, Girón JA, Puente JL. Transcriptional regulation of the ecp operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2012. 194: 5020-5033.
- Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. Am J Med. 2009. 122: 866-873.
- Müller CM, Dobrindt U, Nagy G, Emödy L, Uhlin BE, Hacker J. Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2006. 188:5428-5438.
- Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Microbiol. 2012. 7: 991-1002.
- Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. Infect Immun. 2013. 81: 3009-3017.
- Niveditha S, Pramodhini S, Umadevi S, Kumar S, Stephen S. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). J Clin Diagn Res. 2012. 6: 1478-1482.
- Norman A, Hansen LH, She Q, Sørensen SJ. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. Plasmid. 2008. 60: 59-74.

- Nypaver CM, Thornton MM, Yin SM, Bracho DO, Nelson PW, Jones AE, Bortz DM, Younger JG. Dynamics of human complement-mediated killing of *Klebsiella pneumoniae*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010. 43: 585-590.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998. 11: 589-603.
- Putker F, Bos MP, Tommassen J. Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface. FEMS Microbiol Rev. 2015.
- Rendón MA, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. 104: 10637-10642.
- Rossez Y, Holmes A, Lodberg-Pedersen H, Birse L, Marshall J, Willats WG, Toth IK, Holden NJ. *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. J Biol Chem. 2014. 289: 34349-34365.
- Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Ex Vivo and In Vivo. Infect Immun. 2015. 83: 3325-3333.
- Saldaña Z, De la Cruz MA, Carrillo-Casas EM, Duran L, Zhang Y, Hernandez-Castro R, Puente JL, Giron JA. Production of the *Escherichia coli* common pilus by uropathogenic *E. coli* is associated with adherence to HeLa and HTB-4 cells and invasion of mouse bladder urothelium. PloS one. 2014. 9: e101200.
- Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. BMC Microbiol. 2010. 10: e179.
- Shields RK, Clancy CJ, Hao B, Chen L, Press EG, Iovine NM, Kreiswirth BN, Nguyen MH. Effects of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase subtypes, extended-spectrum β -lactamases and porin mutations on the in vitro activity of ceftazidime-avibactam against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2015. 59: 5793-5797.

- Shu HY, Fung CP, Liu YM, Wu KM, Chen YT, Li LH, Liu TT, Kirby R, Tsai SF. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology*. 2009. 155: 4170-4183.
- Stahlhut SG, Chattopadhyay S, Kisiela DI, Hvidtfeldt K, Clegg S, Struve C, Sokurenko EV, Krogfelt KA. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. *J Bacteriol*. 2013. 195: 5602-5613.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001. 358: 135-138.
- Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun*. 2009. 77: 5016-5024.
- Thanassi DG, Bliska JB, Christie PJ. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2012. 36: 1046-1082.
- Tsering DC, Das S, Adhiakari L, Pal R, Singh TS. Extended Spectrum Beta-lactamase Detection in Gram-negative Bacilli of Nosocomial Origin. *J Glob Infect Dis*. 2009. 1: 87-92.
- Tu YC, Lu MC, Chiang MK, Huang SP, Peng HL, Chang HY, Jan MS, Lai YC. Genetic requirements for *Klebsiella pneumoniae*-induced liver abscess in an oral infection model. *Infect Immun*. 2009. 77: 2657-2671.
- Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*. 2014. 3: 743-758.
- Wu KM, Li LH, Yan JJ, Tsao N, Liao TL, Tsai HC, Fung CP, Chen HJ, Liu YM, Wang JT, Fang CT, Chang SC, Shu HY, Liu TT, Chen YT, Shiau YR, Lauderdale TL, Su IJ, Kirby R, Tsai SF. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol*. 2009. 191: 4492-4501.