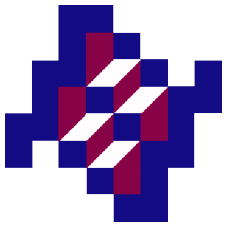


INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MEXICO

ñIDENTIFICACION Y VALIDACION DE MARCADORES MOLECULARES QUE PERMITAN DIFERENCIAR A *Klebsiella variicola* DE *Klebsiella pneumoniae*ò

T E S I S

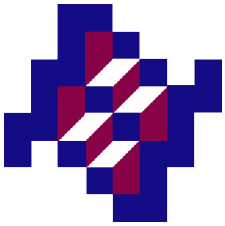
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS CON AREA DE CONCENTRACION EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

P R E S E N T A:

IB. PERLA TINOCO CARRILLO

CUERNAVACA, MORELOS



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CISEI) DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA (INSP).

DURANTE MIS ESTUDIOS DE MAESTRIA FUI BECADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT)

INDICE

Resumen **1**

Introducción **1**

Características del género *Klebsiella* **4**

El género *Klebsiella* en el ambiente **8**

El género *Klebsiella* en el hospital **10**

***Klebsiella variicola* como una nueva especie** **12**

Identificación de *Klebsiella* spp. **13**

Antecedentes **18**

Justificación **21**

Hipótesis **22**

Objetivo general: **22**

Objetivos particulares: **22**

Materiales y Métodos **23**

Resultados **34**

Discusión **55**

Conclusiones: **66**

Perspectivas **67**

Referencias **67**

Resumen

ñIdentificación y validación de marcadores moleculares que permitan identificar a *Klebsiella variicola* de *Klebsiella pneumoniae*ò

Introducción: Las especies del género *Klebsiella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son patógenos Gram negativos, no mótiles y de un aspecto mucoide. Son ubicuas en la naturaleza, colonizando dos hábitats: el ambiente (agua, suelo y plantas); y las superficies mucosas de los mamíferos. En plantas son bacterias endófitas diazotróficas, lo que significa que forman una asociación con la planta hospedera colonizando los tejidos internos y proveen cantidades suficientes de nitrógeno para mitigar la deficiencia de nitrógeno cuando éste es limitado; en mamíferos colonizan las superficies mucosas. La mayoría de las infecciones por *Klebsiella* están asociadas a los procedimientos hospitalarios. Clínicamente la especie más importante del género *Klebsiella* es *Klebsiella pneumoniae*. *K. variicola* es una nueva especie estrechamente relacionada a *K. pneumoniae*; ésta se identificó mediante el análisis de genes que codifican para distintas enzimas. En el estudio se incluyeron aislamientos clínicos y ambientales de *K. pneumoniae*; y por medio de los análisis filogenéticos se determinó que alrededor del 8% de los aislamientos clínicos y ambientales pertenecían a la nueva especie. **Objetivo:** Identificar y validar marcadores moleculares que permitan identificar al género *Klebsiella* y diferenciar a *K. variicola* de *K. pneumoniae.* **Materiales y Métodos:** Para la determinación de los genes únicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola* se compararon los genomas de *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* MGH78578 y *K. pneumoniae* NTUH-K2044) y *K. variicola* (*K. pneumoniae* 342, *K. variicola* 801 y *K. variicola* At-22) mediante BLASTp en línea de comando Linux. Se determinó la categoría funcional de los genes únicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola* mediante BLASTp, y posteriormente se analizaron utilizando BLASTn (discontiguous megablast). Eliminando aquellos genes que estuvieran involucrados en la transferencia horizontal de genes y aquellos presentes en otros microorganismos, se seleccionaron los genes únicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola*. Los oligonucleótidos específicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola* se diseñaron con base en los genes únicos de cada especie. Los oligonucleótidos del género *Klebsiella* se diseñaron

con base en el gen *mtnC* (vía de salvamento de la metionina), gen contenido y utilizado únicamente por *K. pneumoniae*. Se determinó in vitro la especificidad de los oligonucleótidos mediante PCR-single, se utilizaron DNA de cepas controles como: *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. variicola* R801, *R. planticola* ATCC 33531, *R. terrigena* ATCC 33257 y un aislamiento clínico de *K. oxytoca* 5600. Una vez validados los marcadores moleculares, se determinaron las condiciones para PCR-multiplex de los genes específicos de *K. variicola*, *K. pneumoniae* y el género *Klebsiella*. Una vez determinadas las condiciones por PCR-multiplex, se analizaron 190 aislamientos clínicos productores de BLEE (β-lactamasas de espectro extendido) identificados como *K. pneumoniae* provenientes de 20 hospitales. Las cepas fueron aisladas desde 1990 hasta 2009 y pertenecen a grupos clonales diferentes que representan a 499 aislamientos clínicos. **Resultados:** La comparación entre los genomas de *K. variicola* (Kv_801, Kp_342 y Kv_At-22) dio como resultado 114 genes únicos de *K. variicola* y 54 genes únicos de *K. pneumoniae* (Kp_NTUH-K2044 y Kp_MGH78578), de los cuales se seleccionaron 79 genes únicos de *K. variicola* y 40 genes únicos de *K. pneumoniae*. Se seleccionaron los genes metabólicos y estructurales de *K. variicola* y *K. pneumoniae*, por lo que fueron seleccionados 20 genes metabólicos y 12 genes estructurales de *K. variicola*, y cuatro genes metabólicos y seis genes estructurales de *K. pneumoniae*. Posterior al análisis por blastn el número de genes únicos disminuyó a un gen estructural y tres genes metabólicos de *K. variicola*, y dos genes metabólicos de *K. pneumoniae*, de los cuales se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR-multiplex. Se incluyeron los oligonucleótidos del gen *rpoB* como control de amplificación. Posterior a la validación de los oligonucleótidos, se determinaron las condiciones para un PCR-multiplex, este se llevó a cabo a una Tm de 60°C, se utilizó una mezcla de DNA de *K. variicola* 801 y *K. pneumoniae* ATCC 13883 como control positivo. Utilizando una relación equimolar 5:1:1 (25 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. pneumoniae*, y 5 pmol/ reacción de *K. variicola* y el género *Klebsiella*), las sondas moleculares propuestas son las combinaciones: KV1615, KP878 y KmtnC (Sonda A); KV1615, KP888 y KmtnC (Sonda B); y KV770, KP888 y KmtnC (Sonda C). Utilizando las concentraciones 5 pmol/ reacción de *K. pneumoniae*, 1 pmol/ reacción de *K. variicola* y 0.2 pmol/ reacción del género *Klebsiella* las sondas moleculares propuestas son las combinaciones: KV1000, KP878 y KmtnC (Sonda D); KV1000, KP888 y KmtnC (Sonda E); y KV770, KP888 y KmtnC (Sonda F). Se analizaron 190 cepas clínicas, 185 de ellas pertenecen a la especie *K. pneumoniae*,

mientras cinco de ellas pertenecen a la especie *K. variicola*, por lo que la prevalencia de *K. variicola* es de 2.6% y la prevalencia de *K. pneumoniae* es del 97.4%. Los aislamientos de *K. variicola* provienen de estados geográficamente distantes (Tabasco, Morelos y Nuevo León) y fueron aislados en años distintos (1996, 1998, 1999 y 2007). Adicionalmente se analizaron los genes *gyrA* y *rpoB* de los aislamientos ambientales y clínicos incluyendo los controles *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *K. variicola* 801. Mediante los análisis filogenéticos de los genes se comprobó el resultado obtenido por PCR-multiplex. Los aislamientos de *K. variicola* pertenecían a un grupo monofilético distinto al grupo integrado por los aislamientos de *K. pneumoniae*. **Conclusiones:** Debido a la gran identidad que existe entre *K. variicola* y *K. pneumoniae*, y a los diferentes intentos fallidos para poder diferenciarlas bioquímicamente, en este estudio se desarrolló un PCR-multiplex que permite mediante la utilización de sondas moleculares la diferenciación de *K. variicola* y *K. pneumoniae*. Las sondas moleculares pertenecen a genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo celular de *K. variicola* y *K. pneumoniae*, el marcador molecular del género *Klebsiella*, el gen *mtnC* se encuentra presente en ambas especies. Los cinco aislamientos identificados como *K. variicola* pertenecen a estados geográficamente distantes (Tabasco, Morelos y Nuevo León), y fueron aislados en años no consecutivos (1996, 1999 y 2007), por lo que la diseminación de *K. variicola* en comparación de *K. pneumoniae* no es constante. El análisis e identificación de las especies por medio de las sondas moleculares fue comprobada por el análisis filogenético de los genes *rpoB* y *gyrA*, por lo que la sensibilidad y especificidad de las sondas moleculares fue del 100% y las condiciones de reacción pueden ser implementadas en los laboratorios microbiológicos para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae*. Este estudio representa una pequeña ventana del papel que desempeña *K. variicola* en los hospitales.

Introducción

La primera mención de una especie del género *Klebsiella* fue realizada por von Frisch en 1881 y la refirió como un bacilo capsulado; esta bacteria fue aislada de muestras de pacientes con rinoscleroma, una enfermedad granulomatosa crónica de la nariz. El organismo fue llamado por Trevisan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Posteriormente en 1892 Friedländer describió una bacteria aislada del pulmón de un paciente que falleció por neumonía, el organismo fue llamado *Klebsiella pneumoniae*. Finalmente en 1893 se observó un bacilo encapsulado aislado de una secreción nasal de pacientes con ozaena, una rinitis atrófica, la bacteria se denominó *Klebsiella ozaenae* (Brisse et al. 2006; Martínez *et al*. 2004). El género bacteriano *Klebsiella* fue designado por Trevisan en el año 1885 en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834- 1913) (Brisse *et al*. 2006; Martínez *et al*. 2004).

Características del género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, familia constituida por una gran cantidad de especies bacterianas. Estas se caracterizan por ser bacterias Gram negativas, miden alrededor de 0.3 µm de diámetro y 0.6- 6 µm de longitud, son bacterias no mótiles de aspecto mucoide, usualmente presentan cápsula, producen lisina descarboxilasa pero no ornitina descarboxilasa y son bacterias fermentadoras de lactosa. (Brisse *et al*. 2006; Fouts *et al*. 2008)

La taxonomía de *Klebsiella* está caracterizada por una nomenclatura reflejada en un principio por sus características patogénicas y origen, donde se subdividió en tres especies que correspondían a las enfermedades que causaban: *K*. *pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis,* ocasionando neumonía, ozaena y rinoscleroma respectivamente. Debido al desarrollo de nuevos métodos como la taxonomía numérica, la clasificación fue revisada emergiendo tres clasificaciones principales: Cowan, Bascomb y Orskov (Podschun y Ullmann, 1998).

La adopción de una nomenclatura ha sido complicada por el hecho de que algunos países utilizan la clasificación de Cowan mientras que otras naciones prefieren la clasificación de Orskov. Como consecuencia la misma bacteria puede ser denominada *K. pneumoniae* en un país y *K. aerogenes* en otro. La mayoría de los países europeos así como Estados Unidos reconocen la clasificación de Orskov como la predominante, la cual se basa en la clasificación de serotipos de polisacáridos capsulares (Podschun y Ullmann, 1998).

La segunda edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, se clasifica al género *Klebsiella* en cinco especies denominadas *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ornithinolytica* y *Klebsiella planticola*. La especie *K. pneumoniae* comprende las tres subespecies *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Esta clasificación fue basada en taxonomía numérica utilizando caracteres fenotípicos y bioquímicos y datos derivados de estudios de hibridación DNA- DNA (Drancourt *et al*. 2001).

En la década de los años 80´s, los aislamientos ambientales de *Klebsiella* eran clasificados como ñorganismos tipo *Klebsiella*ò y se clasificaron en un grupo taxonómico provisional, resultando en cuatro nuevas especies: *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella orhithinolytica*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella trevisanii*. En 1986 las especies *K. planticola* y *K. trevisanii* fueron combinados en una única especie, *K. planticola*, debido a la extensa homología que presentaban en el DNA. Posteriormente estos aislamientos ambientales se les reconoció con el género *Raoultella* en honor al bacteriólogo francés Didier Raoult, denominación basada en análisis de secuencias de 16S RNA ribosomal y del gen *rpoB* (Drancourt *et al*. 2001), sin embargo esta clasificación no es bien aceptada por otros microbiólogos.

La búsqueda de mecanismos patogénicos en infecciones causadas por el género *Klebsiella*, ha apoyado a la identificación de factores bacterianos que contribuyen a la patogénesis de la bacteria. Los principales factores de virulencia implicados en la patogénesis de *Klebsiella pneumoniae* son: polisacáridos capsulares, fimbrias o adhesinas, sideróforos y lipopolisacáridos (Williams y Tomas, 1990, Lai *et al*. 2000) (Figura 1).

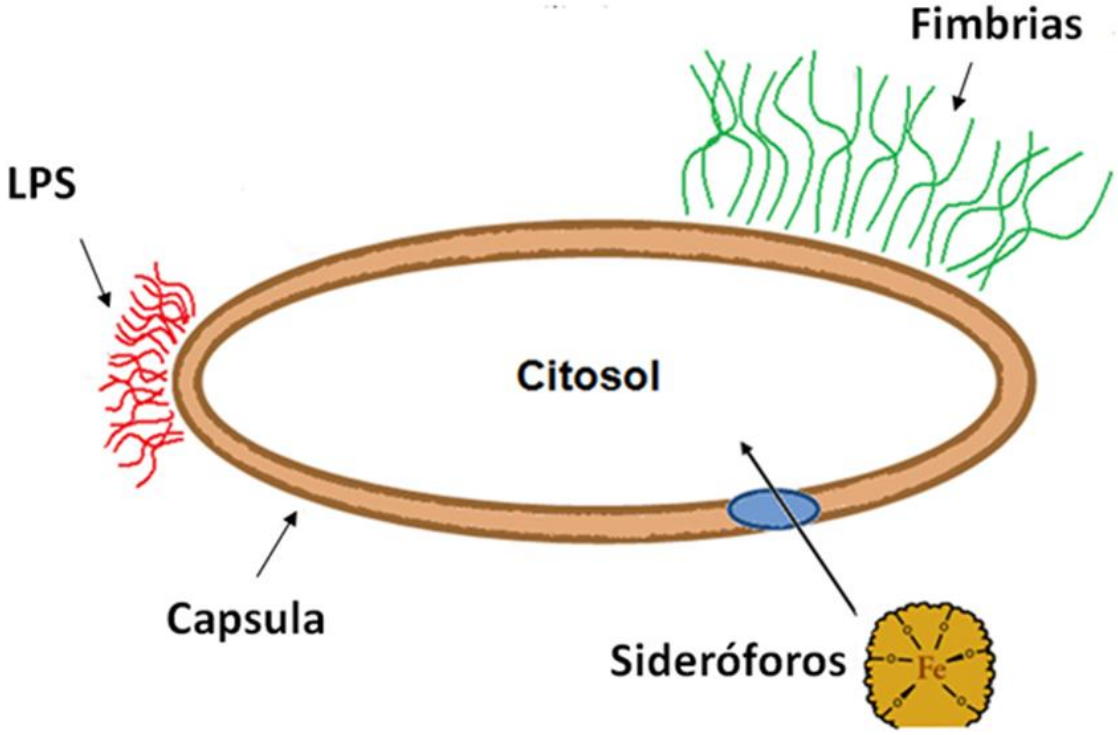


Figura 1. Representación esquemática de los factores de patogenicidad de *Klebsiella* spp.(Modificado de Podschun y Ullmann, 1998).

La adhesión a la mucosa y a las superficies epiteliales de las células es el primer paso en el desarrollo de la infección, el microorganismo debe acercarse y mantenerse unido a la superficie mucosa del hospedero. Las propiedades adhesivas del microorganismo están mediadas por diferentes tipos de pili o fimbrias. Los pili son proyecciones filamentosas no flagelares que se encuentran en la superficie bacteriana. Son estructuras que consisten en subunidades de proteínas globulares (pilina). En el género *Klebsiella* se encuentran dos tipos de pili predominantes, que se diferencian en base a su capacidad de ser inhibidas por D- manosa. (Brisse *et al*. 2006; Podschun y Ullmann, 1998)

Las fimbrias de tipo 1 son ñhemaglutininas D- manosa sensiblesò (MS-HA), ocasionan la aglutinación de eritrocitos en cobayos, las proteínas adhesivas son capaces de unirse a trisacáridos de las glicoproteínas del hospedero que contienen manosa y median la unión de la bacteria a células uroepiteliales. Las fimbrias de tipo 3 son ñhemaglutininas resistentes a manosa de tipo *Klebsiella*ò (MR/K-HA), pueden aglutinar eritrocitos solo si han sido tratados previamente con ácido tánico y en ausencia o presencia de D- manosa y pueden mediar la unión a raíces de plantas, células endoteliales humanas, el epitelio del tracto respiratorio, células uroepiteliales, entre otras (Brisse *et al*. 2006; Podschun y Ullmann, 1998; Podschun *et al*. 2001).

La colonización de la membrana mucosa es seguida por la invasión del tejido. La invasión de las células del hospedero también es facilitada por una cápsula delgada de polisacáridos que rodea la célula bacteriana, esta cápsula es responsable del aspecto mucoide de las células. La cápsula actúa como una barrera y protege a la bacteria de la fagocitosis (Highsmith y Jarvis, 1985), está compuesta de repeticiones de cuatro a seis subunidades de azúcares y a menudo contienen acido uránico, y pueden ser clasificadas en alrededor de 77 tipos serológicos. El incremento en la virulencia conferida por el material capsular es debido a la protección contra la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares e inhibe la activación de los componentes del complemento (Brisse *et al*. 2006, Podschun y Ullmann, 1998).

El lipopolisacárido (LPS) está compuesto de lípido A formado por un disacárido compuesto por dos unidades de N-acetilglucosamina, un núcleo formado por monosacáridos de seis carbonos, y finalmente el antígeno O que se dispone fuera de la célula actuando como receptor de bacteriófagos. Se han descrito nuevos antígenos O en *K. pneumoniae*, siendo el antígeno O1 el más frecuente. El papel más importante del antígeno O es la protección de *K. pneumoniae* contra la acción del complemento (Brisse *et al*. 2006, Podschun y Ullmann, 1998).

El crecimiento de la bacteria en el tejido del hospedero no solo es limitado por los mecanismos de defensa del hospedero, sino también por la disponibilidad de hierro. El hierro es un factor esencial para el crecimiento bacteriano, en situaciones limitantes las bacterias producen sistemas de gran afinidad denominados sideróforos para solubilizar e importar el hierro requerido; y los componentes quelantes de hierro secretados pertenecen a dos grupos químicos diferentes: los sideróforos de tipo fenolato como

enterochelina y los sideróforos de tipo hidroxamato como aerobactina. Mientras la enterochelina es hidrolizada por una esterasa posterior a la liberación del hierro, la aerobactina puede ser reciclada después de cada ciclo de transporte de hierro (Brisse *et al*. 2006, Podschun y Ullmann, 1998).

Todos los componentes patogénicos tienen una gran importancia y la patogenicidad de la bacteria es resultado de la acción conjunta de varios de estos factores (polisacáridos capsulares, fimbrias o adhesinas, sideróforos y lipopolisacáridos) (Williams y Tomas, 1990, Lai *et al*. 2000), que permitirán a la bacteria entrar y multiplicarse en el interior de las células del hospedero, evadir el sistema inmune y producirle un daño.

El género *Klebsiella* en el ambiente

Las especies del género *Klebsiella* son ubicuas en la naturaleza, tienen dos hábitats comunes donde colonizan; en el ambiente donde es encontrada en agua, suelo, insectos y plantas; y en las superficies mucosas de mamíferos (Podschun y Ullmann, 1998; Podschun *et al*. 2001; Doolittle *et al*. 2008). En humanos se encuentran en los epitelios de la nariz, faringe y en tracto gastrointestinal (Brisse y Verhoef, 2001). También se les ha asociado con artritis en humanos, mastitis en bovinos (Grimont *et al*. 2000), rinitis crónica atrófica y diarreas hemorrágicas o infecciones fatales en humanos (Martínez *et al*. 2004).

Una bacteria endófita es aquella que forma una asociación con la planta hospedera colonizando los tejidos internos, es detectada dentro de plantas cuya superficie fue esterilizada o extraída del interior de plantas y no causan una lesión o daño en las estructuras simbióticas (Hallmann *et al*. 1997; Mohanta *et al*. 2010; Rosenblueth *et al*. 2004). Las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno son conocidas como endófitas diazotróficas, estas bacterias pueden proveer cantidades suficientes de nitrógeno a los hospederos para mitigar la deficiencia de nitrógeno capacitándolos para colonizar ambientes con condiciones donde el nitrógeno es limitado (Rosenblueth *et al*., 2004; Iniguez *et al*. 2004; Chelius y Tripplett, 2000, Kneip *et al*. 2007).

En la biósfera se requiere la incorporación de nitrógeno a moléculas biológicas a través de la fijación de nitrógeno. Este es un proceso en el cual los organismos procariontes reducen nitrógeno (N2) a amonio (Canfield *et al*. 2010) y se libera hidrógeno molecular (H2) (Masepohl y Kranz, 2008). El amonio es utilizado para la biosíntesis de aminoácidos y otras biomoléculas que contienen nitrógeno.

Algunos organismos eucariontes llevan a cabo la fijación de nitrógeno, pero únicamente en asociación con organismos procariontes fijadores de nitrógeno (Kneip *et al*. 2007; Canfield *et al*. 2010). La reducción de nitrógeno a amonio es catalizado por la enzima nitrogenasa (Kneip *et al*. 2007). La capacidad de fijar nitrógeno es restringida a algunas especies bacterianas que expresan la enzima (Kneip *et al*. 2007). La nitrogenasa hidroliza ~16 moléculas de ATP por molécula de N2 fijada (Kneip *et al*. 2007; Canfield *et al*. 2010). Las bacterias diazotróficas regulan la síntesis y actividad de la nitrogenasa en respuesta a varios factores ambientales como disponibilidad de amonio y presión parcial de oxígeno.

Diversas especies bacterianas han sido reportadas que promueven el crecimiento de las plantas, los organismos más comunes entre las bacterias endófitas aisladas de tejidos de plantas como alfalfa, maíz, algodón, pepino, limón, caña de azúcar, papa, trigo, uva, plátano, arroz, tomate, entre otros, son *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Serratia* y *Rhizobia* (Burdmann *et al*., 2000; Rosenblueth *et al*., 2004; Hallmann *et al*. 1997; Iniguez *et al*. 2004; Mohanta *et al*. 2010).

Se han descrito diversas vías de entrada de los organismos en las raíces tales como: a través de heridas, que ocurren naturalmente en los puntos donde emergen las raíces secundarias y en los ápices de las raíces como resultado del crecimiento de la planta, en los pelos laterales que pueden desarrollarse como extensiones de las células epidermales de la raíz cerca del ápice y por la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular como es el caso de pectinasas y celulasas (Kovtunovych *et al*.1999; Cocking, 2003; Mano y Morisaki, 2008). En *Klebsiella pneumoniae* se ha descrito la participación de pectato liasa durante la colonización en plantas (Kovtunovych *et al*. 1999). Una vez dentro, las bacterias se diseminan rápidamente proliferando en los espacios intercelulares y migran activamente (Cocking, 2003).

En estudios con aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en los cuales se han inoculado campos de maíz en Estados Unidos se han obtenido mejores cosechas probablemente debido a la fijación biológica de nitrógeno (Rosenblueth *et al*. 2004). De la cepa *Klebsiella pneumoniae* 342 se ha demostrado que la aplicación de la cepa en cultivos de trigo, disminuye la deficiencia de nitrógeno en las plantas, en ausencia de un fertilizante. Esta cepa fue aislada de maíz y coloniza un amplio rango de plantas hospederas (Iniguez *et al*. 2004; Chelius y Triplett, 2000).

La razón práctica para el estudio de las bacterias diazotróficas es proveer una porción del nitrógeno necesario para las plantas, reduciendo la aplicación de fertilizantes químicos y pesticidas que son potencialmente contaminantes en los cultivos agrícolas (James, 2000; Mohanta *et al*. 2010; Triplett, 1996).

El género *Klebsiella* en el hospital

La gran mayoría de las infecciones por *Klebsiella* están asociadas con la hospitalización, *Klebsiella* spp. es el agente causal del 7 y 10% de todas las infecciones nosocomiales (infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en periodo de incubación en el momento del internado (Organización Mundial de la Salud, 2002)) reportadas en Europa, Latino América y Norte América y es uno de los ocho principales agentes infecciosos en los centros hospitalarios (Podschun y Ullmann, 1998; Biedenbach *et al*. 2004). Como agente causal de infecciones nosocomiales, *Klebsiella pneumoniae* es el segundo patógeno después de *Escherichia coli* (Schembri *et al*. 2005).

Klebsiella spp. como patógenos oportunistas principalmente atacan a individuos inmunocomprometidos que se encuentran hospitalizados y sufren enfermedades severas, tal es el caso de diabetes mellitus u obstrucción pulmonar crónica (Podschun y Ullmann, 1998). La especie clínicamente más importante del género *Klebsiella* es *Klebsiella pneumoniae*, está comúnmente asociada a infecciones en el tracto urinario (UTI), neumonía, septicemia, infecciones en heridas, en pacientes quemados y pacientes con fibrosis quística.

Los antibióticos β- lactámicos son los antimicrobianos más prescritos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias, esta clase de antibióticos exhiben sus efectos bactericidas inhibiendo PBPs (Penicillin Binding Proteins), enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular; y la producción de β- lactamasas es el principal mecanismo de resistencia a esta clase de antibióticos. La resistencia es un problema de salud pública a nivel mundial y la presión selectiva, el uso indiscriminado y la falta de políticas para la regulación del uso de antimicrobianos para el tratamiento de infecciones en pacientes han seleccionado nuevas variantes de β- lactamasas (Bradford, 2001; Drawz y Bonomo, 2010).

La primer β- lactamasa contenida en un plásmido reportada en Gram- negativos que hidroliza penicilina y sus derivados como ampicilina, carbenicilina, piperacilina fue TEM-1 en los años 1960´s (Datta y Kontmichalou , 1965; Livermore, 1995; Chaves *et al*. 2001). Otra β- lactamasa común en *K. pneumoniae* y *E. coli* es SHV-1, siendo TEM y SHV las BLEEs más comunes, que se han encontrado principalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, también han sido encontradas en *Proteus* spp., *Providencia* spp., y otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (Bradford, 2001).

Las mutaciones puntuales caracterizadas dentro del gen pueden generar el fenotipo de amplio espectro, debido al incremento en el espectro de la actividad estas enzimas son denominadas β- lactamasas de espectro extendido (BLEEs) (Bradford 2001). Actualmente se han descrito 137 SHV- (SHV-1 a SHV- 137) y 183 TEM- (TEM-1 a TEM-183) (http://www.lahey.org/studies/webt.htm).

Las BLEE confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos β- lactámicos como cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, excepto a carbapenémicos y cefamicinas (Coque *et al*. 2008). Las β- lactamasas pueden ser parte del cromosoma bacteriano o pueden ser llevadas en plásmidos y debido a esto pueden ser fácilmente diseminadas a través de distintas especies bacterianas.

En México se han descrito *K. pneumoniae* productoras de TEM-1, CTX-M-15, SHV-1, SHV-2, SHV- 12 y principalmente SHV- 5, los aislamientos productores de BLEE pertenecen a brotes intrahospitalarios. (Martínez- Aguilar *et al.* 2001, González- Vertiz *et al.* 2001, Martínez- Aguilar *et al.* 2001, Silva *et al.* 2001, Andrade *et al.* 2004, Alcantar-

Curiel *et al.* 2004, Miranda *et al.* 2004, Garza- Ramos *et al.* 2007, Mosqueda- Gómez *et al.* 2008, Garza- González *et al.* 2011).

Klebsiella pneumoniae presenta una resistencia intrínseca a antimicrobianos tales como ampicilina, carbenicilina y ticarcilina. Estudios previos han indicado que dicha resistencia es consecuencia de la producción intrínseca de la β- lactamasa SHV-1, que se encuentra en el cromosoma de *K. pneumoniae* (Babini y Livermore, 2000), sin embargo estudios recientes que utilizan técnicas más especificas determinaron que la BLEE SHV-1 solo se encuentra en algunos aislamientos de *K. pneumoniae* (Haeggman *et al*. 2004).

Klebsiella variicola como una nueva especie

Anteriormente se consideraba que las cepas únicamente podían habitar en un sólo ambiente, es decir, las cepas clínicas eran exclusivas de ambientes hospitalarios y las cepas ambientales únicamente se podían encontrar en el suelo, agua o plantas. Actualmente se han realizado reportes donde se demuestra la diseminación de aislamientos ambientales en ambientes hospitalarios.

En un estudio se incluyeron seis cepas ambientales (plátano, arroz, caña de azúcar y maíz) y 131 cepas clínicas (sangre, secreciones y orina) identificadas como *Klebsiella pneumoniae*. Se analizaron las secuencias de seis genes (*mdh, gyrA, phoE, infB, rpoB* y *nifH*) y se realizaron hibridaciones DNA-DNA. Por medio del análisis filogenético de los genes se distinguieron dos agrupaciones de cepas, alrededor del 8% de los aislamientos integraban un grupo, el análisis tuvo como resultado la propuesta de una nueva especie denominada *Klebsiella variicola*, especie estrechamente relacionada con *K. pneumoniae*. Los aislamientos de *Klebsiella variicola* se distinguen por su incapacidad de utilizar adonitol como fuente de carbono, siendo una posible característica para identificar a ambas especies (Rosenblueth *et al*. 2004).

Identificación de *Klebsiella* spp.

Las especies de *Klebsiella* son usualmente identificadas y diferenciadas de acuerdo a sus reacciones bioquímicas. La mayoría de las especies pueden ser identificadas por pruebas microbiológicas convencionales, en cambio las especies *R. terrigena* y *R. planticola* requieren reacciones especiales tales como la utilización de m-hidroxilbenzoato, degradación de pectato, y crecimiento a 10°C; sin embargo la diferenciación de *K. variicola* de *K. pneumoniae* aun no se ha logrado utilizando pruebas bioquímicas convencionales o métodos automatizados.

Las características fenotípicas más utilizadas para la identificación de las especies del género *Klebsiella* son dadas en la tabla 1.

La correcta identificación de las especies de *Klebsiella* no se ha logrado fácilmente en la mayoría de los laboratorios microbiológicos debido a que varias especies comparten perfiles bioquímicos similares (Alves et al. 2006). La mayoría de los kits comerciales, métodos bioquímicos convencionales así como los automatizados no incluyen a algunos organismos en sus bases de datos para su identificación o los substratos necesarios para poder diferenciar las especies, por lo que son requeridos otros tipos de métodos más específicos para la correcta identificación de los microorganismos (Westbrooke *et al*. 2000).

El desarrollo de métodos rápidos para la diferenciación de especies en los laboratorios clínicos y microbiológicos es necesario para determinar si existen diferencias significativas epidemiológicas y patogénicas entre las especies del género *Klebsiella*.

Tabla 1. Características clave de *Klebsiella* y *Raoultella* spp (Modificado de De la Maza *et al*. 2004 y Brisse *et al*. 2006).

	K. pneumoniae / *K. variicola*	*K. ozaenae*	*K. rhinoscleromatis*	*K. oxytoca*	*R. terrigena*	*R. planticola*	*R. ornithinolytica*
Motilidad	-	-	-	-	-	-	-
Urea	+	V	-	+	+	+	+
Pectato	-	-	-	+	-	-	-
ONPG	+	+	-	+	+	+	+
Rojo de metilo	-	+	+	-	V	+	+
Indol	-	-	-	+	-	V	+
VP	+	-	-	+	+	+	+
Citrato	+	V	-	+	V	+	+
Malonato	+	-	+	+	+	+	+
Lisina	+	V	-	+	+	+	+
Ornitina	-	-	-	-	-	-	+
Adonitol	V	+	+	+	+	+	+
L- Arabitol	-	-	-	V	-	-	-
L- Ramnosa	+	V	+	+	+	+	+
D- Sorbitol	+	V	V	+	+	+	+
L- Sorbosa	V	V	-	+	+	+	+
Sacarosa	+	V	+	+	+	+	+

+ : Reacción positiva; V: Reacción variable; - : Reacción negativa
VP: Vogues- Proskauer; ONPG: o- nitrofenil- β- D- galactopiranosido

Recientemente, se reportó un estudio cuyo objetivo era implementar un test de pruebas bioquímicas rápido para identificar las especies del género *Klebsiella*. Esta prueba consistió en utilizar adonitol como fuente de carbono que permitiera la diferencia de *K. variicola* de *K. pneumoniae*, así como el análisis de secuencias del gen *rpoB* como un método de referencia (Alves *et al*. 2006)

En base a los resultados se propusieron tres pruebas adicionales para incluirlas en la identificación rutinaria de las especies: el crecimiento a 10°C, asimilación de histamina y D-melezitosa, así como la presencia de ornitina descarboxilasa. Sin embargo la prueba del adonitol como posible característica para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* fue variable entre distintos aislamientos de *K. variicola* (KpIII) y *K. pneumoniae* (KpI), por lo que con la utilización de esta prueba no es posible identificar a ambas especies, y necesario el uso de técnicas filogenéticas para la correcta identificación de las especies del género *Klebsiella* (Alves *et al*. 2006).

La identificación de especies de *Klebsiella* por métodos moleculares es actualmente el más utilizado, debido a que la identificación fenotípica no permite identificar correctamente especies, como es el caso de *K. variicola* y *K. pneumoniae* (Rosenblueth *et al*. 2004, Alves *et al*. 2006).

Anteriormente el análisis de la secuencia del gen 16S RNA ribosomal era utilizado ampliamente para la identificación, sin embargo el análisis ha demostrado no distinguir aislamientos estrechamente relacionados (Palys *et al*. 1997) debido a la variación nucleotídica imitada en sus secuencias (Brisse y Verhoef, 2001), por lo que el análisis con 16S RNAr no es viable para la identificación de especies bacterianas.

Actualmente se ha propuesto que es suficiente el análisis de cinco genes para obtener datos filogenéticos para identificar las especies bacterianas (Stackebrandt *et al*. 2002). En base a variaciones nucleotídicas de los genes *gyrA*, *parC* y *rpoB* los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* pueden situarse en tres grupos filogenéticos distintos denominados KpI, KpII y KpIII (Brisse y Verhoef 2001) (Figura 2). La cepa tipo de *K. variicola* se encuentra en el grupo KpIII (Brisse *et al*. 2004; Rosenblueth *et al*. 2004).

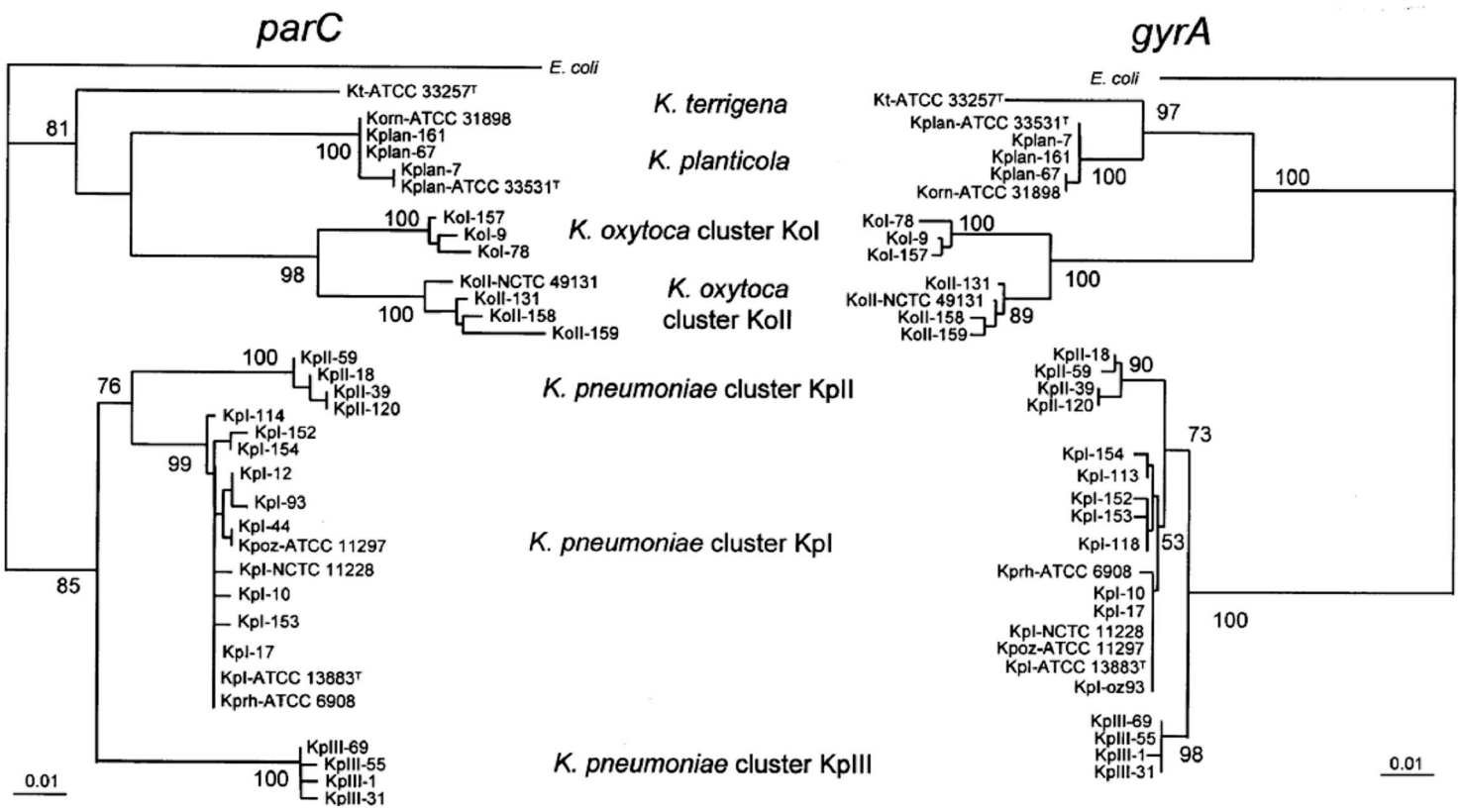


Figura 2. Análisis filogenético de los genes *gyrA* y *parC*. En el análisis se incluyeron 48 aislamientos de *K. pneumoniae* y ocho cepas de referencia. La escala indica la distancia de las ramas o proporción de disimilitud de nucleótidos entre las secuencias. Los números en los nodos del árbol indican los valores bootstrap (Brisse y Verhoef, 2001).

Haeggman y colaboradores determinaron que la β- lactamasa SHV-11 únicamente es un gen cromosomal en los aislamientos clínicos que pertenecen al grupo filogenético KpI, ya que los genes cromosomales de los grupos KpII y KpIII son OKP-1 y LEN-1 respectivamente (Figura 3).

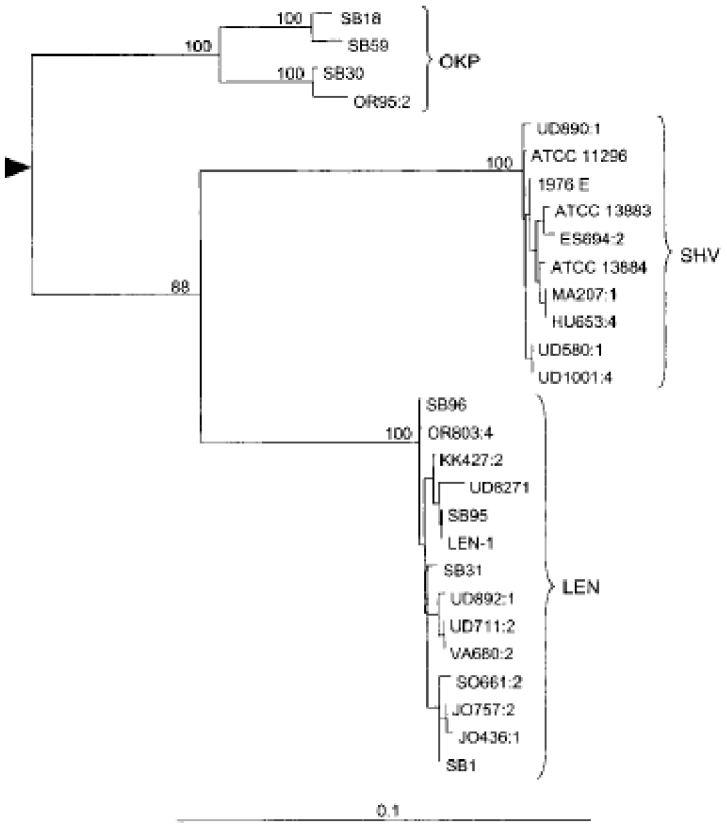


Figura 3. Filogenia del gen de la β- lactamasa cromosomal en *Klebsiella pneumoniae*. Las β-lactamasas OKP, SHV y LEN pertenecen a los grupos filogenéticos KpII, KpI y KpIII respectivamente. La escala indica la distancia de las ramas o proporción de disimilitud de nucleótidos entre las secuencias. Los números en los nodos del árbol indican los valores bootstrap (Haeggman *et al*. 2004).

Recientemente se describió un método rápido que por medio de la amplificación, digestión con enzimas de restricción y análisis de los genes *gyrA* y *parC* es posible la identificación de especies y de grupos filogenéticos (Brisse *et al*. 2004). La correcta identificación de especies bacterianas, y más concretamente la identificación de *K. pneumoniae* y *K. variicola* únicamente puede ser llevada a cabo mediante análisis moleculares.

Antecedentes

Hasta la fecha se han secuenciado completamente los genomas de cuatro Klebsiellas, *K. pneumoniae* MGH78578 (GenBank CP00647), *K. pneumoniae* 342 (Fouts et al. 2008), *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (Wu *et al*. 2009) y *K. variicola* At- 22 (Pinto-Tomás *et al*. 2009), sin embargo solo los genomas de *K. pneumoniae* 342 y *K. pneumoniae* NTUH-K2044 han sido publicados; la secuenciación del genoma de *Klebsiella variicola* 801 recientemente se completó (Esperanza Martínez, comunicación personal) (Tabla 2).

Tabla 2. Genomas secuenciados del género *Klebsiella*.

Cepa	Tipo de aislamiento	Origen	Tamaño de genoma (bp)	Número de plásmidos	Añop	Referencia
K. pneumoniae MGH78578	Clínico	Esputo	5,694,694	5	2007	McClelland, sin publicar
K. pneumoniae NTUH-K2044	Clínico	Sangre	5,248,520	1	2009	Wu *et al*. 2009
K. variicola At-22	Ambiental	Hormiga	5,458,505	0	2010	Pinto- Tomas *et al*. 2009
K. pneumoniae 342 (*K. variicola*)	Ambiental	Maíz	5,641,239	2	2008	Fouts *et al*. 2008
K. variicola 801	Clínico	Sangre	5,705,981	2	2010	E. Martínez, sin publicar

p Año en que fue secuenciado el genoma de la cepa.

Klebsiella pneumoniae MGH78578 y *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044

La cepa *K. pneumoniae* MGH78578 es una aislamiento de esputo de un paciente con neumonía. El aislamiento presenta resistencia a diversos antimicrobianos como ampicilina, ticarcilina, trimetoprim-sulfametoxazol y gentamicina, sin embargo es

susceptible a amikacina, ciprofloxacina e imipenem. El genoma de *K. pneumoniae* MGH78578 ha sido totalmente secuenciado sin embargo, no se ha realizado ninguna publicación y únicamente se encuentra disponible en la base de datos del GenBank.

Se reportó que la cepa *K. pneumoniae* NTUH-K2044 ocasionaba abscesos hepáticos, endoftalmitis y meningitis en Asia, especialmente en Taiwán. La cepa fue aislada de sangre de un paciente con absceso hepático y meningitis, su genoma fue secuenciado debido a la gran virulencia e hipermucosidad que presentaba la cepa y su contenido genómico fue comparado con varios aislamientos clínicos y comunitarios.

Se identificaron siete regiones cromosomales que eran muy diferentes entre los aislamientos, estas regiones pudieron haber sido adquiridas horizontalmente y pertenecen a secuencias de inserción, integrasas, transposasas y genes fimbriales. La diversidad identificó firmas genómicas que asocian patrones de infección con las características clínicas (las infecciones en la comunidad o adquiridas fuera del hospital, frente a la infección hospitalaria; absceso hepático en comparación con otros tipos de infección) y la virulencia de fenotipos observados en ratones (Wu *et al*. 2009).

Se realizó una comparación de los genomas de *K. pneumoniae* MGH78578 y NTUH-K2044, se identificaron secuencias y clusters de genes que son únicos en cada uno de los dos genomas, en *K. pneumoniae* NTUH-K2044 se encontraron operones y clusters de genes que están involucrados en la virulencia de la bacteria, movilización de plásmidos, metabolismo celular y genes que codifican proteínas de membrana (Wu *et al*. 2009).

***Klebsiella variicola* At-22**

La cepa *K. variicola* At-22 es un simbionte de hormiga cortadora de hojas (*Atta* spp.), estas hormigas cultivan hongos para su alimentación utilizando plantas recién cortadas; se analizó la posibilidad de que las hormigas mantuvieran asociaciones mutualísticas con simbiontes fijadores de nitrógeno para proveer nitrógeno a los cultivos de hongos (Pinto- Tomás *et al*. 2009).

Se aislaron bacterias del género *Klebsiella* en 69% de los cultivos de hongos de 80 colonias de hormigas analizadas de Costa Rica y Panamá. El análisis filogenético de la concatenación de los genes *gapA*, *icdA* y *mtlD* reveló que los aislamientos de *Klebsiella* se encuentran en el mismo grupo monofilético con la cepa de *K. variicola* F2R9 (Pinto-Tomás *et al*. 2009).

Las bacterias del género *Klebsiella* fueron reconocidas como simbiontes importantes de las hormigas cortadoras de hojas. El hallazgo se identificó como una fuente importante de nitrógeno fijado en ecosistemas neotropicales (Pinto- Tomás *et al*. 2009).

Klebsiella pneumoniae 342

La cepa de *K. pneumoniae* 342 sirve como modelo para estudios de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno, asociaciones planta-bacteria, así como la colonización eficiente de plantas. El genoma de esta cepa se secuenció con el fin de implementar estrategias para su utilización en los campos agrícolas y disminuir el uso de fertilizantes químicos en la agricultura. En *K. pneumoniae* 342 identificaron genes previamente identificados en otras bacterias que participan en la degradación de componentes aromáticos y celulósicos. Se identificaron genes de virulencia y resistencia a antibióticos como ampicilina, ácido nalidíxico, ticarcilina y tetraciclina, así como genes para la colonización de plantas y fijación de nitrógeno (Fouts *et al*. 2008).

Al realizar el análisis comparativo de los genomas de *K. pneumoniae* 342 con *K. pneumoniae* MGH78578 se identificaron diferencias en el contenido genómico que posiblemente están influenciadas por el hospedero y el estilo de vida de ambas bacterias (*K. pneumoniae* 342 como endófito de plantas y *K. pneumoniae* MGH78578 como patógeno humano). Una de las principales diferencias entre los dos aislamientos es la capacidad de fijar nitrógeno, *K. pneumoniae* MGH78578 no posee los genes necesarios para tal proceso por lo que representa una ventaja para *K. pneumoniae* 342 para sobrevivir en ambientes con bajos niveles de nitrógeno y formar asociaciones con plantas (Fouts *et al*. 2008). A pesar de que *K. pneumoniae* 342 ha sido identificada como *K.*

pneumoniae, se ha reportado que esta cepa podría pertenecer a la especie *K. variicola* debido a que la secuencia del gen *nifH* de *K. pneumoniae* 342 es idéntica a la de la cepa de referencia de *K. variicola* (Rosenblueth *et al*. 2004; Martínez *et al*. 2004).

Klebsiella variicola 801

La cepa *K. variicola* 801 es un aislamiento de sangre proveniente de un neonato que presentaba neumonía en el Hospital del Niño de Tabasco en 1996, esta cepa pertenece a un brote intrahospitalario. Anteriormente se reportó un aislamiento representativo de el brote por Garza-Ramos *et al*. 2007, el aislamiento *K. variicola* 806 presentaba la BLEE SHV-2.

K. variicola 801 contiene dos plásmidos y presenta resistencia a ampicilina, carbenicilina y gentamicina, y por el contrario es susceptible a ácido nalidíxico (Rosenblueth *et al*. 2004). El genoma de *K. variicola* 801 se secuenció parcialmente por pirosecuenciación 454 de Roche, la secuenciación *de novo* obtuvo 105 contigs con un N50 de 131,409, los contigs contienen 5, 705, 981 pares de bases; se obtuvo una cobertura 15X y una calidad de secuencia del 99.82%, los contigs contenían material genómico tanto cromosomal como plasmídico. Los contigs se concatenaron para formar una sola secuencia de DNA y se anotó mediante Sanger Ensembl y TYGER.

Justificación

K. *pneumoniae* ha sido identificada como la causante de múltiples infecciones graves además de presentar multirresistencia, sin embargo dentro de las bacterias identificadas como *K. pneumoniae* fue recientemente (2004) identificada una nueva especie denominada *K. variicola*. Debido a que no pueden ser identificadas por métodos bioquímicos se desconoce desde cuando pertenece a la microflora hospitalaria, no solo en nuestro país sino del mundo, *K. variicola* no puede ser diferenciada de *K. pneumoniae*

por los métodos bioquímicos convencionales, por lo que este proyecto abordó esta problemática con la identificación de marcadores moleculares que permitan diferenciar a ambas especies.

Hipótesis

Análisis preliminares de *Klebsiella variicola* indican que es una especie estrechamente relacionada a *Klebsiella pneumoniae,* no obstante no puede ser diferenciada de *K. pneumoniae* mediante los métodos bioquímicos tradicionales, sin embargo *K. variicola* contiene genes o vías metabólicas exclusivas de la especie que pueden utilizarse como marcadores moleculares para diferenciar ambas especies

Objetivo general:

Identificar y validar marcadores moleculares que permitan identificar al género *Klebsiella* y diferenciar a *K. variicola* de *K. pneumoniae.*

Objetivos particulares:

- Identificar secuencias de genes únicos de *K. variicola* y *K. pneumoniae.*
- Establecer por categorías funcionales las proteínas únicas de *K. variicola y K. pneumoniae.*
- Determinar los marcadores moleculares que permitan identificar al género *Klebsiella* y diferenciar a *K. variicola* de *K. pneumoniae.*

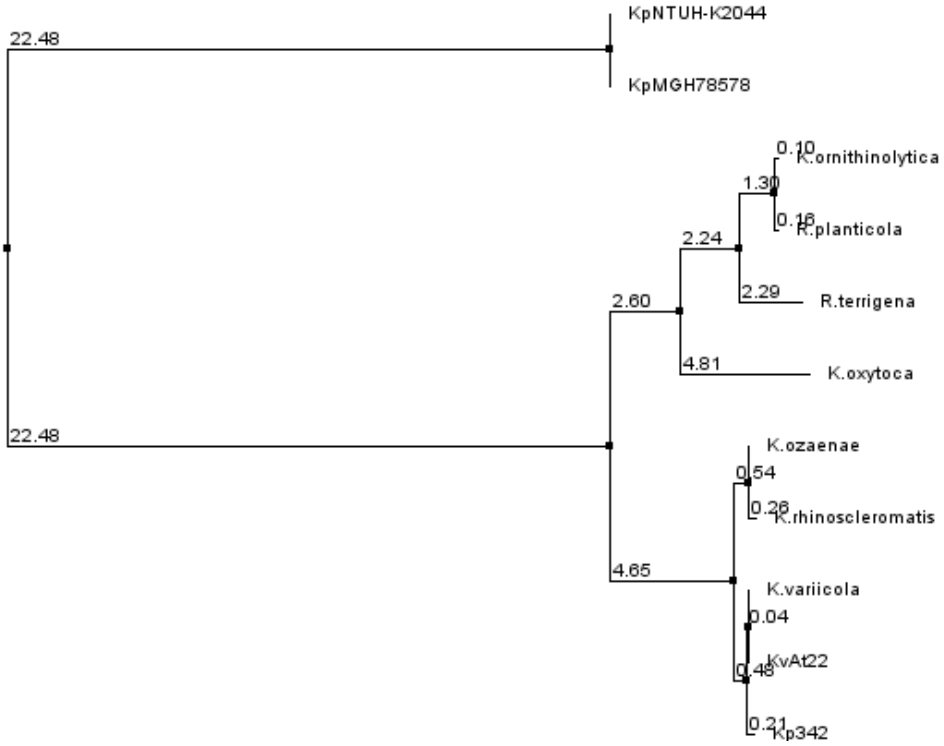
- Validar los marcadores moleculares propuestos.
- Determinar la prevalencia de *K. variicola* entre aislamientos clínicos productores de BLEE de *K. pneumoniae* y correlacionarlos con su resistencia antimicrobiana.

Materiales y Métodos

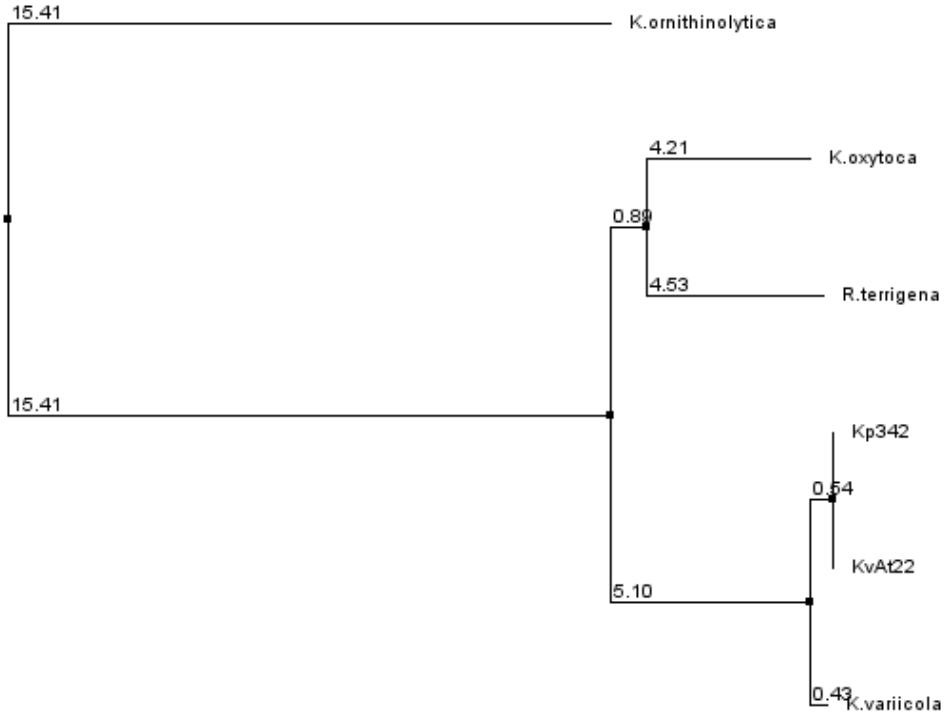
Análisis de *K. pneumoniae* 342

El aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* 342, a pesar de haber sido identificado como *K. pneumoniae*, en este proyecto es considerado como *K. variicola* debido a un análisis de la secuencia del gen *nifH*, se comparó la secuencia del gen de aislamientos clínicos y ambientales incluyendo la cepa *K. pneumoniae* 342; el gen *nifH* de *K. pneumoniae* 342 mostró una gran similitud con los genes de los aislamientos identificados como *K. variicola* (Rosenblueth *et al*. 2004). A raíz de estos resultados E. Martínez (comunicación personal) y Martínez *et al*. 2004 consideran que *K. pneumoniae* 342 podría pertenecer a *K. variicola,* por lo que se llevó a cabo un análisis por nuestro grupo de trabajo.

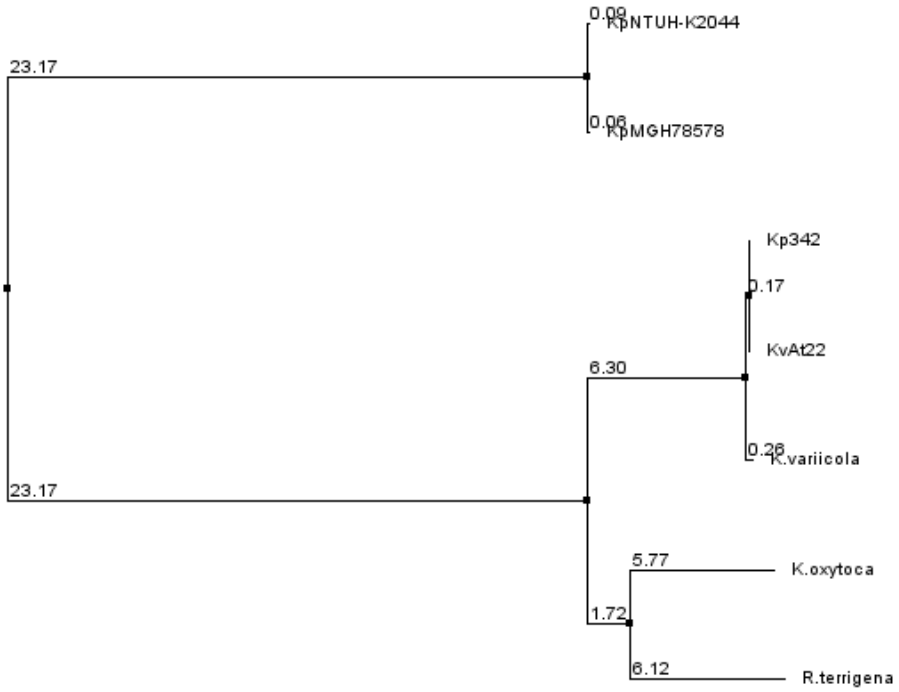
Se compararon las secuencias de cuatro genes housekeeping (*gyrA*, *mdh*, *infB* y *nifH*) correspondientes a *K. pneumoniae* NTUH-K2044, *K. pneumoniae* MGH78578, *K. pneumoniae* 342, *K. ozaenae*, *K. variicola* 801, *K. variicola* At-22, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis*, *R. rhinoscleromatis*, *R. terrigena* y *R. planticola*. Se encontró que la cepa *K. pneumoniae* 342 tiene una gran similitud con las secuencias de los genes de *K. variicola* R801 y *K. variicola* At-22 (Figura 4), por lo que esto da pauta para incluirla en la especie *K. variicola*.


KpNTUH-K2044
22.48
KpMGH78578
0.10
K.ornithinolytica
1.30
0.16
R.planticola
2.24
2.29
R.terrigena
2.60
4.81
K.oxytoca
22.48
K.ozaenae
0.54
0.26
K.rhinoscleromatis
4.65
K.variicola
0.04
KvAt22
0.48
0.21
Kp342

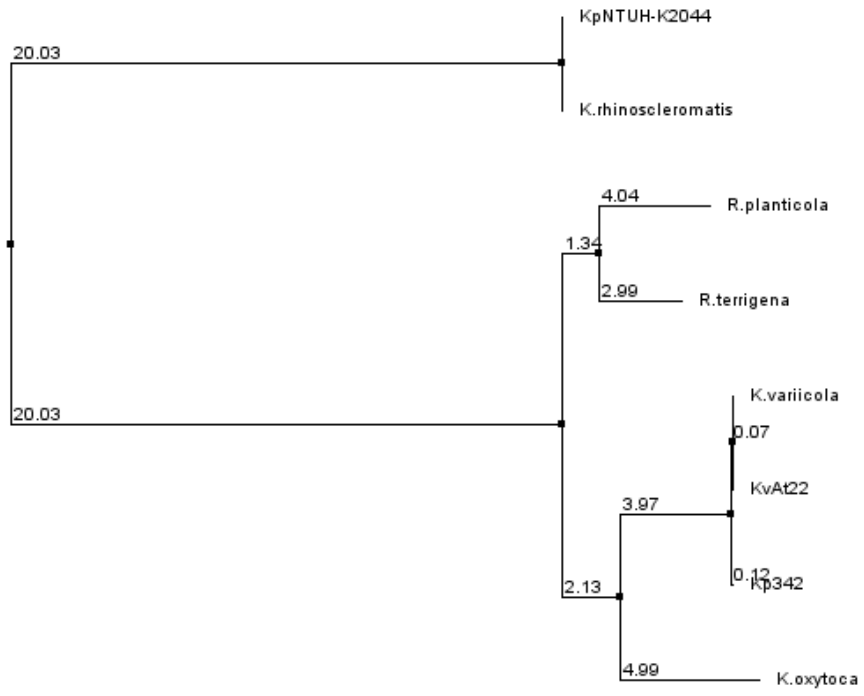
A) gyrA


15.41
K.ornithinolytica
4.21
K.oxytoca
0.89
4.53
R.terrigena
15.41
Kp342
0.54
KvAt22
5.10
0.43
K.variicola

B) nifH


0.09
KpNTUH-K2044
23.17
0.06
KpMGH78578
Kp342
0.17
KvAt22
6.30
0.26
K.variicola
23.17
5.77
K.oxytoca
1.72
6.12
R.terrigena

C) mdh


KpNTUH-K2044
20.03
K.rhinoscleromatis
4.04
R.planticola
1.34
2.99
R.terrigena
K.variicola
20.03
0.07
KvAt22
3.97
0.12
Kp342
2.13
4.99
K.oxytoca

D) infB

Figura 4. Análisis filogenético por Neighbour-Joining de los genes housekeeping *gyrA*, *nifH*, *mdh* e *infB*. A) *gyrA*. *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (NC_012731.1), *K. pneumoniae* MGH 78578 (NC_009648.1), *K. pneumoniae* 342 (NC_011283.1), *K. variicola* 801 (AY367372.1), *K. variicola* At22 (NC_013850.1), *K. oxytoca* (AY301157.1), *K. rhinoscleromatis* (AF303620.1), *R. terrigena* (AF303617.1), *R. planticola* (AF303621.1), R. ornithinolytica (AF303618.1), K. ozaenae (AF303619.1). B) *nifH*. *K. pneumoniae* 342 (NC_011283.1), *K. variicola* 801 (AY367395.1), *K. variicola* At22 (NC_013850.1), *K. oxytoca* (AY221827.1), *R. terrigena* (AY367396.1), R. ornithinolytica (FJ823000.1). C) *mdh*. *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (NC_012731.1), *K. pneumoniae* MGH 78578 (NC_009648.1), *K. pneumoniae* 342 (NC_011283.1), *K. variicola* 801 (AY367378.1), *K. variicola* At22 (NC_013850.1), *K. oxytoca* (AY367380.1), *R. terrigena* (AY367381.1). D) *infB*. *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (NC_012731.1), *K. pneumoniae* 342 (NC_011283.1), *K. rhinoscleromatis* (NZ_ACZD01000131.1), *R. terrigena* (AY367391.1) y *R. planticola* (AY367390.1); las secuencias del gen de *K. variicola* 801 y *K. variicola* At22 fueron tomadas de la secuencia del genoma.

Comparación de genomas de *K. pneumoniae* y *K. variicola*

Los genomas anotados de *K. pneumoniae* MGH78578 y NTUH-K2044, y de *K. pneumoniae* 342 (Kp_342) (clasificada como *K. variicola*), *K. variicola* 801 (Kv_801) y *K. variicola* At-22 (Kv_At22) fueron instalados en una base de datos en sistema operativo Linux. Para la determinación de los genes únicos tanto de *K. pneumoniae* (Kp_NTUH-K2044 y Kp_MGH78578) y *K. variicola* (Kv_801, Kv_At-22 y Kp_342) se compararon los genomas mediante BLASTp en línea de comando Linux.

En el caso de los genomas de *K. variicola* el análisis comparativo se realizó mediante una comparación (BLASTp) del aislamiento de *K. variicola* 801 (Kv_801) contra el aislamiento Kp_342, el resultado se comparó con Kv_At-22, teniendo como resultado genes compartidos entre los genomas de *K. variicola*. Posteriormente la base de datos que contienen los hits (genes compartidos entre los genomas correspondientes a *K. variicola*) se comparó con los genomas de Kp_MGH78578 y Kp_NTUH-K2044, y se extrajo una lista de secuencias que son no compartidas entre los genomas, obteniendo una base de datos que contenga secuencias únicas de la especie *variicola* (Figura 5).

De igual manera, se realizó la comparación de los genomas de la especie *pneumoniae*, Kp_MGH78578 y Kp_NTUH-K2044, se extrajeron las secuencias que comparten ambos genomas; posteriormente la base de datos se comparó con el genoma de Kv_801, se extrajo una lista de secuencias que no son compartidas, posteriormente se compararon contra la Kp_342 y contra Kv_At-22 para obtener una base de datos que contenga secuencias únicas de la especie *pneumoniae* (Figura 5) (García-López, D. 2010).

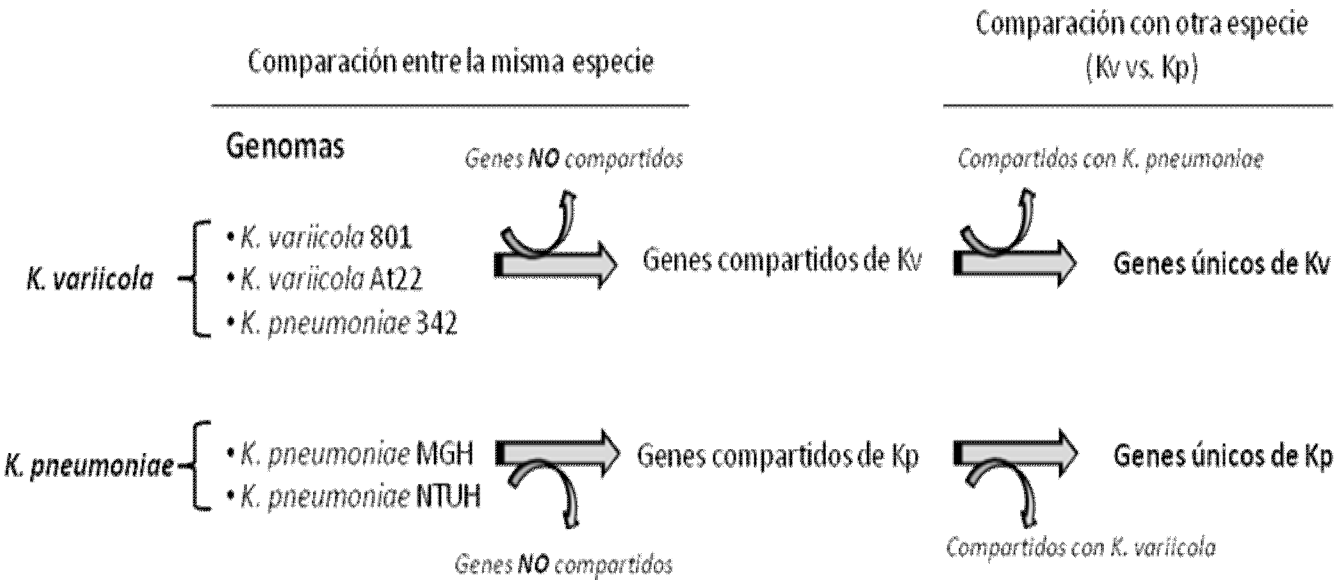


Figura 5. Esquema del análisis comparativo de los genomas de *K. variicola* y *K. pneumoniae*.

Determinación de categoría funcional de genes únicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola*

Se determinó la categoría funcional de los genes únicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola* utilizando el programa computacional BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Se seleccionó una lista de genes exclusivos de cada genoma, posteriormente se analizaron cada uno para eliminar aquellos que estén implicados en la transferencia horizontal de material genético o que estén presenten en otros organismos, conservando

aquellos que posean una función conocida o no conocida (putativa) y sean únicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola*.

Diseño de oligonucleótidos específicos de *K. pneumoniae*, *K. variicola* y el género *Klebsiella*

Los oligonucleótidos específicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola* se diseñaron en base a los genes únicos de cada especie, resultado del análisis comparativo anterior. Los genes propuestos como posibles marcadores moleculares no deben estar involucrados en la transferencia horizontal de material genético y deben encontrarse únicamente en *Klebsiella pneumoniae* o *Klebsiella variicola*.

Los oligonucleótidos específicos del género *Klebsiella* se diseñaron a partir de un análisis previo por Wu *et al*. 2009 (material suplementario), los autores analizaron la vía metabólica de salvamento de la metionina en la cual encontraron un gen llamado *mtnC* (Numero de acceso GenBank: 7947966), el cual está contenido y es utilizado únicamente por *K. pneumoniae* en dicha vía metabólica (Figura 6).

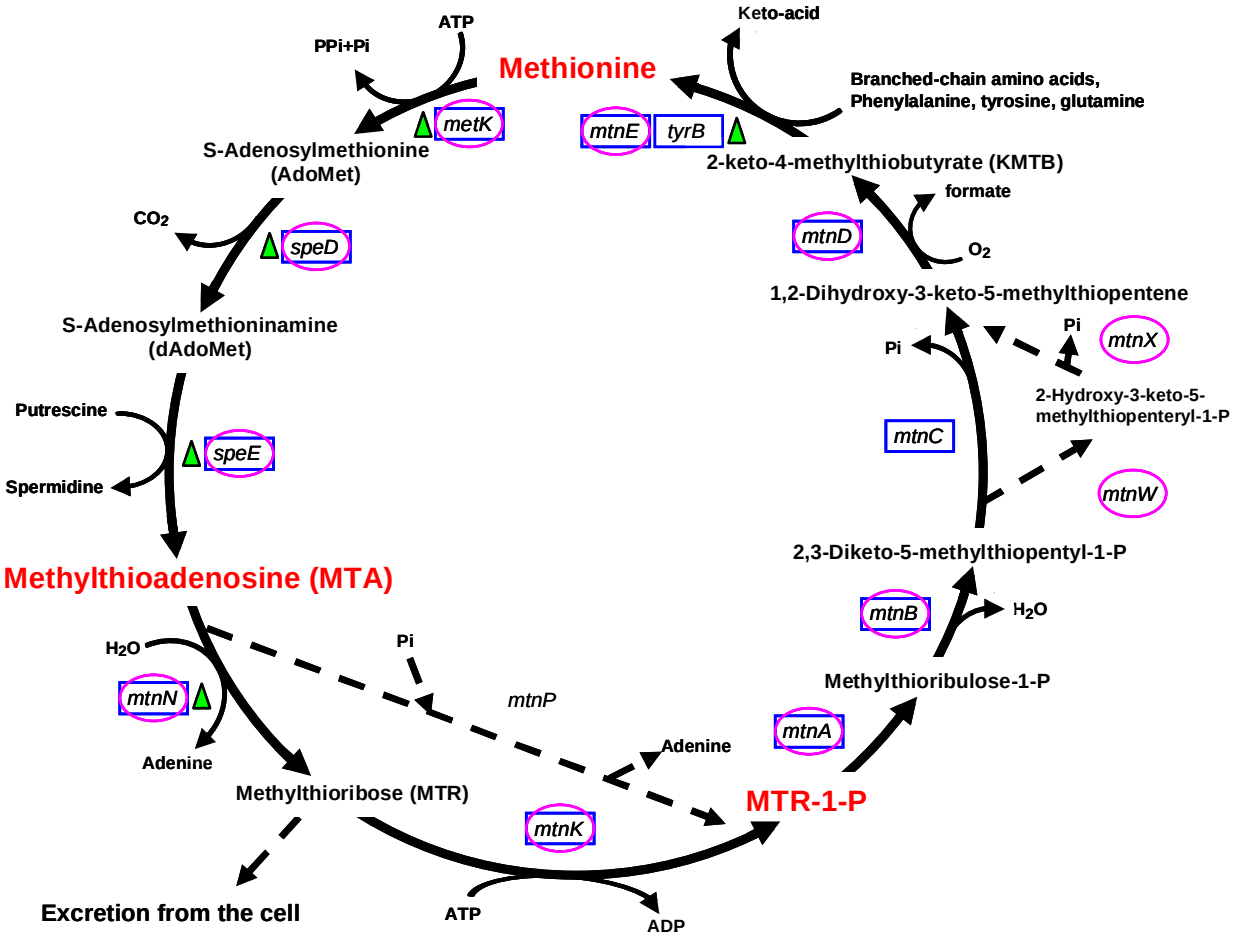


Figura 6. Representación de la vía de salvamento de la metionina. Los genes señalados con un rectángulo azul están contenidos en *K. pneumoniae*, los genes señalados con una elipse rosa están contenidos en *B. subtilis* y los genes señalados con un triángulo verde están contenidos en los géneros *Escherichia*, *Photorhabdus*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella* (Wu *et al*. 2009).

Los oligonucleótidos se diseñaron a fin de que su Tm se encontrara entre 58°C y 62°C a fin de que éstos pudieran amplificar un fragmento de DNA a una sola temperatura de annealing durante el proceso del PCR, y también se diseñaron de tal manera que amplificaran bandas de diferentes tamaños para cada una de la especie y del género *Klebsiella*, y así poder diferenciar a la especie correspondiente mediante el tamaño de banda amplificada (Figura 7).

Condiciones para el PCR-single y PCR-múltiplex

Para determinar *in vitro* que los oligonucleótidos diseñados son específicos de *K. pneumoniae*, *K. variicola* y/o *Klebsiella* spp. se amplificaron los genes marcadores mediante PCR-single utilizando DNA de cepas controles tales como *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. variicola* R801, *R. planticola* ATCC 33531, *R. terrigena* ATCC 33257 y una aislamiento clínico de *K. oxytoca* 5600.

Una vez identificada la amplificación de los oligonucleótidos con los marcadores, se determinaron las condiciones para la amplificación simultánea de los genes específicos de *K. variicola*, *K. pneumoniae* y el género *Klebsiella* por PCR-multiplex, que es la amplificación de múltiples fragmentos de DNA en una sola reacción. En la figura 7 se muestra el modelo teórico del PCR-multiplex de los marcadores moleculares propuestos.

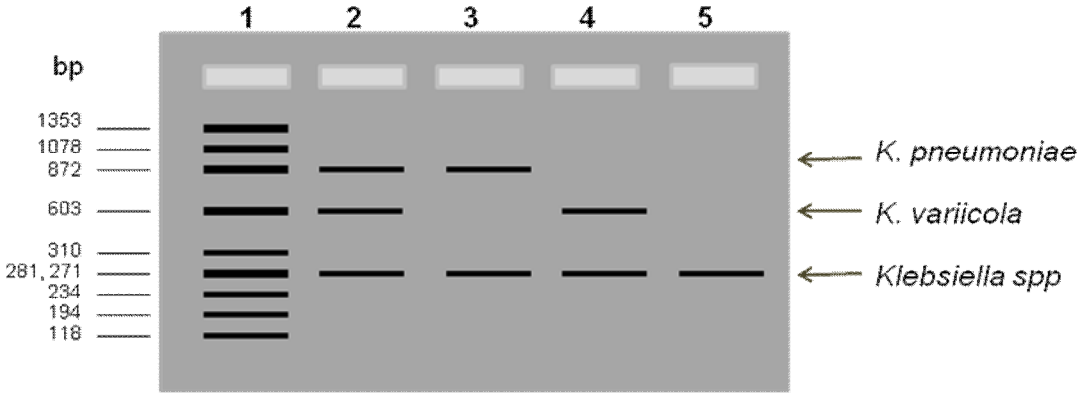


Figura 7. Esquema teórico de la amplificación por PCR-multiplex de los genes únicos de *K. variicola*, *K. pneumoniae* y el género *Klebsiella*. Carril 1 Marcador de PM φX174/Hae III, Carril 2 combinación del DNA de *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *K. variicola* 801, Carril 3 DNA de *K. pneumoniae* ATCC 13883, Carril 4 DNA de *K. variicola* 801, Carril 4 DNA de aislamiento perteneciente al género *Klebsiella*, excepto de *K. pneumoniae* y *K. variicola*. Gel de agarosa 1%.

Amplificación por PCR de β- lactamasas de espectro extendido

Para amplificar los genes de β- lactamasas de espectro extendido se emplearon los oligonucleótidos: T1 y T2 (844 bp del gen bla_{TEM}); P1 y P2 (291 bp del gen bla_{SHV}); CTX-MF y CTX-MR (811 bp del gen bla_{CTX}); y los oligonucleótidos TLA-1HINDF y TLA- 1R (660 bp del gen bla_{TLA}) (Tabla 3).

La mezcla de reacción se llevó a cabo a un volumen final de 25 µl con una concentración final de 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 2.5 pmol del oligonucleótido de la β- lactamasa , 1U de Taq DNA polimerasa y 2.5 µl de la solución que contiene el DNA. El DNA fue extraído por medio de choque térmico, mediante ebullición y congelación a 100°C y -70°C respectivamente, y se hizo una dilución 10^{-1} con H_2O bidestilada.

La mezcla de reacción estuvo sujeta a un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C, seguida por 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 1 min. a 72°C y una extensión final de 7 min. a 72°C, en un termociclador. Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 1 hr en solución amortiguadora TAE 1X (40 mM Tris- HCl, 2 mM ácido acético, 1 mM EDTA), el gel se tiñó con bromuro de etídio (5 µg/ml). Las bandas de DNA se visualizaron con luz UV y se fotografiaron. Se usó como marcador de peso molecular a φX174/Hae III.

Tabla 3. Oligonucleótidos de BLEE utilizados en este estudio.

Oligonucleótido Ð	Secuencia (5´- 3´)	Gen	Tamaño de amplificación (bp)
CTX-MF	GCT GTT GTT AGG AAG TGT G	CTX-M	811
CTX-MR	GGT GAC GAT TTT AGC CGC C		
P1	ACT GAA TGA GGC GCT TCC	SHV	291
P2	TCC CGC AGA TAA ATC ACC		
T1	CAA CAT TTT CGT GTC GCC C	TEM	844
T2	GCT TAA TCA GTG AGG CAC C		
TLA- 1HINDF	GAT AAG GAG AAT ATT TCC ATT G	TLA	660
TLA- 1R	CTA TTT CCC ATC CTT AAC TAG		
fCM7	CCT GAA CAA CAC GCT CGG A	*rpoB*	730
rpoB-medio	GAG TCA ACG GCA ACA GCA CG		
gyrA-KF	TGG ATT ATG CGA TGT CGG TC	*gyrA*	396
gyrA-KR	GCT CCG TAC CGT CAT AGT TG		

Ð Los oligonucleótidos se tomaron en base a: P1- P2: Prodinger et al. 1996; T1- T2: Espinosa de los Monteros et al. 2008; CM7: Mollet et al. 1997; *rpoB*- medio: Mónica Rosenblueth (comunicación personal). Los demás oligonucleótidos fueron diseñados para este estudio.

Determinación de prevalencia de *K. variicola* y *K. pneumoniae* en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*

El análisis se realizó mediante PCR-multiplex diseñado en este estudio a 190 aislamientos clínicos previamente identificados como *K. pneumoniae* provenientes de hospitales de la República Mexicana y Colombia de los cuales 40 ya habían sido descritos anteriormente (Silva *et al*. 2001; Andrade *et al*. 2004; Miranda *et al*. 2004; Rosenblueth *et al*. 2004; Mosqueda- Gómez *et al*. 2008; Garza- Ramos *et al*. 2007; Espinal *et al*. 2010). Las cepas fueron aisladas desde 1990 hasta 2009, son aislamientos clínicamente representativos causantes de infecciones intrahospitalarias y pertenecen a grupos clonales diferentes que representan a 499 aislamientos intrahospitalarios (Tabla 4).

Tabla 4. Aislamientos clínicos analizados en el estudio.

Hospital	Estado	No. cepas	No. Cepas representadas Ð	Años de aislamiento
Hospital General de Campeche	Campeche	6	11	2001- 2003
Hospital San Jerónimo de Barranquilla	Atlántico p	4	4	2001- 2002
Clínica General del Norte de Montería	Córdoba p	3	6	2003
Instituto de Ciencias Medicas y Nutrición, Salvador Zubirán	Distrito Federal	6	17	1990, 1993, 1997, 2000, 2002
Hospital Infantil CMN	Distrito Federal	8	42	1991, 1996- 1997
Hospital de Pediatría	Distrito Federal	13	140	1996- 1997
Hospital General de Acapulco	Guerrero	14	14	2007- 2009
Hospital Civil de Guadalajara	Jalisco	34	38	2006- 2009
Hospital Infantil de Morelia, Eva Sámano de López Mateos	Michoacán	16	67	1996, 1999- 2000
Hospital General, José G. Parres	Morelos	2	36	1996, 1998, 1999
Hospital de Niño Morelense	Morelos	6	6	2000- 2001, 2004
Rio Mololoa	Nayarit	5	5	2009
Hospital de altas especialidades No. 25, IMSS	Nuevo León	4	4	2006- 2007
Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas	Nuevo León	54	74	2006- 2008
Hospital San José	Nuevo León	1	1	2008
Hospital Central, Dr. Ignacio Morones Prieto	San Luis Potosí	7	19	2002- 2004
Hospital Infantil de Sonora	Sonora	4	4	2000- 2001
ISSSTESON	Sonora	1	1	2009
Hospital del Niño de Tabasco	Tabasco	1	6	1996
Centro Médico de Especialidades, Dr. Rafael Lucio	Veracruz	1	4	2008
	Total	**190**	**499**	

p Aislamientos clínicos de Colombia.

Ð Análisis llevado a cabo por PFGE (Electroforesis en Gel por Campos Pulsados).

Resultados

Análisis comparativo de los genomas

La comparación entre los genomas de *K. variicola* (*K. variicola* 801, *K. pneumoniae* 342 y *K. variicola* At-22) dio como resultado 114 genes únicos de *K. variicola* y 54 genes únicos de *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* NTUH-K2044 y *K. pneumoniae* MGH78578) (Tabla 5). Se eliminaron aquellos genes que estuvieran involucrados en la transferencia horizontal de genes y aquellos genes que estuvieran contenidos en otros microorganismos dando como resultado 79 genes únicos de *K. variicola* y 40 genes únicos de *K. pneumoniae*. El análisis de los genes por clases funcionales se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Genes exclusivos de *K. pneumoniae* y *K. variicola*

Función	**Genes únicos**	
	K. variicola	***K. pneumoniae***
Hipotéticos	15	26
Hipotéticos conservados	18	-
Metabólicos	20	4
Estructurales	12	6
Regulatorios	10	4
Transferencia horizontal	3	-
Otros microorganismos	36	14
Total	**114**	**54**

De los genes únicos de ambas especies se seleccionaron los genes involucrados en el metabolismo y la estructura celular debido a la conservación de estos genes en cada especie bacteriana durante la evolución. Por lo que se seleccionaron 20 genes metabólicos y 12 genes estructurales de *K. variicola*, y cuatro genes metabólicos y seis genes estructurales de *K. pneumoniae* (Tabla 6).

Tabla 6. Genes metabólicos y estructurales exclusivos de *K. variicola* y *K. pneumoniae*.

Clase funcional				
	Proteínas metabólicas		**Proteínas estructurales**	
	K. variicola	***K. pneumoniae***	***K. variicola***	***K. pneumoniae***
	Transportador de azúcar, homologo a SotB Epimerasa dependiente de NAD Acetil transferasa, familia Gnat Proteína de la familia glioxalasa Proteína de familia fosfoglicerato mutasa Nitrilo hidratasa, subunidad beta Nitrilo hidratasa, subunidad alfa Proteína familia thiopurina S-metiltransferasa N- acetiltransferasa relacionada a GCN5 Cistein desulfurasa, familia SufS Adenililtransferasa putativa Cistein sintasa B putativa Proteína NifY Proteína de familia NifZ Proteína de familia NifZ Proteína de fijación de nitrógeno NifM Proteína de fijación de nitrógeno NifQ Proteína glucolactonasa SMP-30, familia LRE Oxidoreductasa dependiente de FAD Proteína de familia prolina racemasa	Fosfohidrolasa dependiente de metal putativa, subdominio HD Proteína precursora de Factor 1 que modifica sulfatasas Homoserina deshidrogenasa Transferasa putativa	Proteína de la familia OsmC Proteína de membrana putativa Proteína de membrana integral Proteína de membrana putativa Proteína de membrana putativa Proteína de familia MipA Proteína periplásmica, transportador de péptidos ABC Transportador de azúcar ABC putativo Transportador de aminoácidos ABC Proteína fimbrial Proteína con dominio transportador Proteína con dominio transportador	Permeasa, sistema de transporte de maltosa Proteína de transporte putativa, familia MFS Proteína de membrana interna putativa Proteína de membrana interna putativa ATPasa de transporte de Mg+2 putativa Proteína de transporte de aminoácidos putativa
Total	**20**	**4**	**12**	**6**

Posteriormente estos genes seleccionados se analizaron nuevamente por blastn utilizando la opción discontiguous megablast, opción que permite un análisis de las secuencias a un nivel menos estricto ya que permite que las secuencias contengan mismatches.

Posterior a este análisis, las secuencias que se seleccionaron fueron aquellas que únicamente tenían similitud con genes contenidos en los genomas de *K. variicola* (Kv_801, Kv_At-22 y Kp_342) o *K. pneumoniae* (Kp_MGH78578 y Kp_NTUH-K2044) según fuere el caso. En la figura 8, podemos ver un ejemplo. Posterior al análisis, se seleccionaron cuatro genes únicos de *K. variicola* (tres genes metabólicos y un gen estructural) y dos genes únicos de *K. pneumoniae* (genes metabólicos), de los cuales se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR-multiplex (Tabla 7).

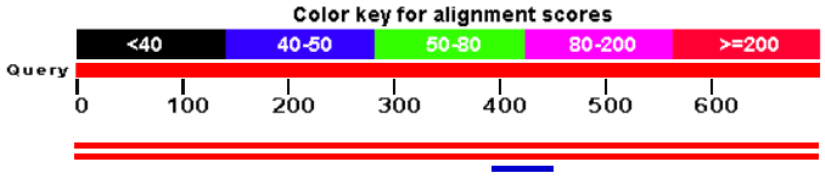


Figura 8. Representación de análisis por blast del gen único de *Klebsiella variicola* y/o *Klebsiella pneumoniae*. En el ejemplo se muestra el análisis por blastp de una tiopurina metil-transferasa (KV1000) de *K. variicola*. Las dos líneas en rojo representan a los genes que identifican a los genomas (Kv_At-22 y Kp_342).

Análisis del marcador molecular del género *Klebsiella*

Se realizó un blastn de la secuencia de nucleótidos del gen *mtnC* tomada del genoma de *K. pneumoniae* NTUH-K2044, el análisis mostró únicamente 22 secuencias de genes similares de las cuales siete presentaron una identidad mayor al 95%, siendo la más próxima a esa identidad la secuencia del gen *mtnC* que pertenece a *Pantoea vagans* con un 49% de identidad. Las secuencias que tuvieron una identidad mayor al 95% con el gen *mtnC* de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 correspondían a *K. pneumoniae* NTUH-K2044,

K. pneumoniae MGH78578, *K. pneumoniae* 342, *K. variicola* At22, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 y *Enterobacter* sp. 638, teniendo las primeras cuatro una identidad del 100%, las demás presentaron una identidad del 98% y 96%.

Se realizó un alineamiento considerando las secuencias de los genes que corresponden a *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (GenBank ID: AP006725.1), *K. pneumoniae* MGH78578 (GenBank ID: CP000647.1), *K. pneumoniae* 342 (GenBank ID: CP000964.1), *K. variicola* At-22 (GenBank ID: CP001891.1) y *K. oxytoca* (GenBank ID: U00148.1). El alineamiento múltiple se llevó a cabo mediante ClustalX 2.0 (Figura 9).

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                     5         15         25         35         45         55         65         75
Kp_NTUH-K2044    CTGGAGAAAC CATGATCCGC GCCATCGTGA CCGACATAGA AGGCACCACC AGCGATATCC GCTTCGTGCA TAACGTGCTG
Kp_MGH78578      CTGGAGAAAC CATGATCCGC GCCATCGTGA CCGACATAGA AGGCACCACC AGCGATATCC GCTTCGTGCA TAACGTGCTG
Kp_342           CTGGAGAAAC CATGATCCGC GCCATCGTGA CCGACATAGA AGGCACCACC AGCGATATCC GCTTCGTGCA TAACGTGCTG
Kv_At22          CTGGAGAAAC CATGATCCGC GCCATCGTGA CCGACATAGA AGGCACCACC AGCGATATCC GCTTCGTGCA TAACGTGCTG
K.oxytoca        CTGGAGAACT CATGATCCGC GCTATCGTGA CCGATATTGA AGGCACCACC AGCGACATTC GCTTCGTCCA CAACGTTCTG
Clustal Co       ********   ********** ** ******* **** ** ** ********** ***** ** * ******* **  ***** ***

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                     85         95         105        115        125        135        145        155
Kp_NTUH-K2044    TTCCCCTACG CCCGCGAACG ACTGGCCGGC TTTGTGACCG CTCAGCAGCA CGCTGAACCG GTCAAAACCA TTCTCGACAA
Kp_MGH78578      TTCCCCTACG CCCGCGAACG ACTGGCCGGC TTTGTGACCG CTCAGCAGCA CGCTGAACCG GTTAAAACCA TTCTCGACAA
Kp_342           TTCCCCTACG CCCGCGAACG ACTGGCCGGC TTTGTGACCG CTCAGCAGTA CGCTGAGCCC GTCAAAACCA TTCTCGACAA
Kv_At22          TTCCCCTACG CCCGCGAACG ACTGGCCGGC TTTGTGACCG CTCAGCAGTA CGCTGAGCCC GTCAAAACCA TTCTCGACAA
K.oxytoca        TTCCCGTACG CCCGCGAACG CCTGGCCGGT TTCGTTACCG CTCAGCAGTT TGTCGAGCCG GTGAAGACCA TTCTCGATAA
Clustal Co       ***** **** **********  ********  ** ** **** ********    *  ** **  ** ** **** ******* **

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    165        175        185        195        205        215        225        235
Kp_NTUH-K2044    CCTGCGCCGC GAAACAGACG CCCCCGCCGC CAGCACCGCC GACCTTATCA CTACCCTCTT CGCCTTTATG GATGAAGACC
Kp_MGH78578      CCTGCGCCGC GAAACAGACG CCCCCGCCGC CAGCACCGCC GACCTTATCA CTACCCTCTT CGCCTTTATG GATGAAGACC
Kp_342           CCTGCGCCGC GAGACAGACG CCCCGGCCGC CAGCACCGCC GACCTTATCA CTACCCTCTT CGCCTTTATG GACGAAGACC
Kv_At22          CCTGCGCCGC GAGACAGACG CCCCGGCCGC CAGCACCGCC GACCTTATCA CTACCCTCTT CGCCTTTATG GACGAAGACC
K.oxytoca        CCTGCGCGAA GAGATCGCCC AGCCGGCGGC TGGCGCCGAA GAACTTATTG CTACCCTCTT CGCCTTTATG GATGAAGACC
Clustal Co       *******    ** *  * *    ** ** **   ** ***   ** *****   ********** ********** ** *******

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    245        255        265        275        285        295        305        315
Kp_NTUH-K2044    GTAAATCCAC GGCGCTGAAG GCGCTGCAGG GGATCATCTG GCGTGACGGC TATCTCAACG GCGACTTTAC CGGCCATCTC
Kp_MGH78578      GTAAATCCAC GGCGCTGAAG GCGCTGCAGG GGATCATCTG GCGCGACGGC TATCTCAACG GCGACTTTAC CGGCCATCTC
Kp_342           GTAAATCCAC GGCGCTAAAG GCGCTGCAGG GGATCATCTG GCGTGACGGC TATCTCAACG GCGACTTTAC CGGCCATCTC
Kv_At22          GTAAATCCAC GGCGCTAAAG GCGCTGCAGG GGATCATCTG GCGTGACGGC TATCTCAACG GCGACTTTAC CGGCCATCTC
K.oxytoca        GCAAATCGAC CGCCCTCAAG GCGCTGCAGG GCATTATCTG GCGCGATGGC TACGTTCATG GCGACTTTAC CGGCCACCTG
Clustal Co       * ***** **  ** ** *** ********** * ** ***** *** ** *** **  *  * * ********** ****** **
```

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    325        335        345        355        365        375        385        395
Kp_NTUH-K2044    TACCCGGACG TACTGCCGGC GCTGGAGAAA TGGAAAGCGC AGGGTATTGA TCTGTATGTA TATTCCTCAG GTTCCGTGGC
Kp_MGH78578      TACCCGGACG TACTGCCGGC GCTGGAGCAA TGGAAAGCGC AGGGTATTGA TCTGTATGTA TATTCCTCAG GCTCGGTGGC
Kp_342           TATCCGGACG TACTGCCGGC GCTGGAGAAA TGGAAAGCGC AGGGCATTGA TCTGTATGTA TATTCCTCAG GCTCCGTTGC
Kv_At22          TATCCGGACG TACTGCCGGC GCTGGAGAAA TGGAAAGCGC AGGGCATTGA TCTGTATGTA TATTCCTCAG GCTCCGTCGC
K.oxytoca        TATCCGGATG TTCTGCCGGC GCTGGAAAAA TGGAAGTCAC AGGGTATTGA TTTATATGTA TATTCCTCAG GCTCCGTTGC
Clustal Co       ** ***** * * ******** ******  ** *****  * * **** ***** * * ****** ********** * ** ** **

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    405        415        425        435        445        455        465        475
Kp_NTUH-K2044    TGCGCAGAAA TTGTTATTTG GCTACAGCGA TGAAGGTGAT ATTACTCATC TGTTCACGGG CTATTTCGAT ACCCTGGTAG
Kp_MGH78578      TGCGCAGAAA TTGTTATTTG GCTACAGCGA TGAAGGTGAT ATTACTCATC TGTTCACGGG CTATTTCGAT ACCCTGGTAG
Kp_342           CGCGCAGAAA TTGTTATTTG GCTACAGCGA TGAAGGTGAT ATTACTCATC TGTTCACGGG CTATTTCGAT ACCCTGGTAG
Kv_At22          CGCGCAGAAA TTGTTATTTG GCTACAGCGA TGAAGGTGAT ATTACTCATC TGTTCACGGG CTATTTCGAT ACCCTGGTAG
K.oxytoca        TGCGCAGAAA TTGTTATTTG GCTACAGCGA TGAAGGTGAT ATTACTCATC TGTTCAACGG CTATTTCGAT ACCCTGGTAG
Clustal Co        ********* ********** ********** ********** ********** ******  ** ********** **********

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    485        495        505        515        525        535        545        555
Kp_NTUH-K2044    GCGCCAAACG TGAGGTGCAG TCCTACCGTA ACATTGCTGA ACACCTGGGC CATGCCCCTG GCACCATCCT GTTCCTGTCG
Kp_MGH78578      GC-CCAAACG TGAGGTGCAG TCCTACCGTA ACATTGCTGA ACACCTGGGC CATGCCCCTG GC-CCATCCT GTTTCTGTCG
Kp_342           GCGCCAAACG CGAGGTGCAG TCCTACCGTA ACATTGCTGA ACACCTGGGC CATGCCCCTG GCACCATCCT GTTCCTGTCG
Kv_At22          GCGCCAAACG CGAGGTGCAG TCCTACCGTA ACATTGCTGA ACACCTGGGC CATGCCCCTG GCACCATCCT GTTCCTGTCG
K.oxytoca        GTGCCAAGCG TGAAGCGCAG TCCTACCGCA ACATTGCTGA GCAACTGGGA CAGCCTCCTG CCGCCATCCT GTTCCTGTCC
Clustal Co       *  **** **  ** * **** ******** * **********  ** *****  **  * ****  * ******* *** *****

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    565        575        585        595        605        615        625        635
Kp_NTUH-K2044    GATATCCATC AGGAGCTCGA CGCCGCCGAG GCCGCGGGTT TGCGAACGAT CCAGTTGGTA CGCGGCGACC GCGACCCGGC
Kp_MGH78578      GATATCCATC AGGAACTTGA TGCCGCCGAG GCCGCGGGTT TG-GAACGAT CCAGTTGGTA CGCGGCGACC GCGACCCGGC
Kp_342           GATATCCATC AGGAGCTCGA CGCCGCCGAG GCTGCAGGTT TGCGAACGAT CCAGCTGGTA CGCGGCGACC GCGACCCGGC
Kv_At22          GATATCCATC AGGAGCTCGA CGCCGCCGAG GCTGCAGGTT TGCGAACGAT CCAGCTGGTA CGCGGCGACT GCGACCCGGC
K.oxytoca        GATATTCATC AGGAGCTGGA TGCCGCGGAA GAGGCCGGTT TCCGCACCCT ACAGCTGGTG CGCGGCGACC GCGACCCGGC
Clustal Co       ***** **** **** ** **  ***** **  *  ** **** *  * **  *  *** ****  *********  **********
```

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                   645        655        665        675        685        695
Kp_NTUH-K2044   GAGCCACCAT CCTCAGGTTC AGCGTTTTGA CGACATTCAT CCGGAGCAGA TCCCAGCATG
Kp_MGH78578     GAGCCACCAT CCTCAGGTTC AG-GTTTTGA CGACATTCAT CCGGAGCAGA TCCCAGCATG
Kp_342          GAGCCACCAT CCTCAGGTTC AGCGTTTTGA CGACATTCAT CCGGAGCAGA TCCCAGCATG
Kv_At22         GAGCCACCAT CCTCAGGTTC AGCGTTTTGA CGACATTCAT CCGGAGCAGA TCCCAGCATG
K.oxytoca       CAGCCACCAT CCGCAGGTTC AGCGTTTTGA CGATATTCAT CCGGAGCAGA TCCCAGCATG
Clustal Co       ********* ** ******* ** ******* *** ****** ********** **********
```

Figura 9. Alineamiento múltiple del gen *mtnC* de *K. pneumoniae* NTUH-K2044, *K. pneumoniae* MGH78578, *K. pneumoniae* 342, *K. variicola* At-22 y *Klebsiella oxytoca*. En negritas y subrayadas se muestra la secuencia de los oligonucleótidos del gen *mtnC*.

El diseño de los oligonucleótidos del género *Klebsiella* (gen *mtnC*) se determinó mediante la selección de un fragmento de la secuencia en el cual las secuencias de las cepas *K. pneumoniae* NTUH-K2044, *K. pneumoniae* MGH78578, *K. pneumoniae* 342 y *K. variicola* At-22 son mas conservadas y menos conservadas en las demás cepas para evitar la hibridación de los oligonucleótidos durante la PCR.

Condiciones para PCR-multiplex de genes únicos de *K. variicola*, *K. pneumoniae* y el género *Klebsiella*

Para amplificar el gen marcador del género *Klebsiella*, se emplearon los oligonucleótidos: KmtnC- F y KmtnC- R que amplifican un fragmento de 340 bp (gen *mtn*C). Para las sondas de la especie *K. variicola* se emplearon los siguientes oligonucleótidos: KV1615-Fy KV1615-R (449 bp del gen *ORF01615*); KV2602-F y KV2602-R (438 bp del gen *ORF02602*); KV1000-F y KV1000-R (499 bp del gen *ORF01000*); KV770-F y KV770-R (350 bp del gen *ORF0770*). Para las sondas de la especie *K. pneumoniae* se emplearon los siguientes oligonucleótidos: KP878-F y KP878-R (878 bp del gen *c3158181*) y los oligonucleótidos KP888-F y KP888-R (888 bp del gen *14800640)* (Tabla 7).

La mezcla de reacción se llevó a cabo a un volumen final de 25 µl con una concentración final de 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato, 2.5 pmol de cada oligonucleótido de los genes del género y de la especie *variicola* y 12.5 pmol de los oligonucleótidos de la especie *K. pneumoniae* y 1U de Taq DNA polimerasa, 2.5 µl de la solución que contiene el DNA. El DNA fue extraído por medio de choque térmico, mediante ebullición y congelación a 100°C y -70°C respectivamente, y se hizo una dilución 10^{-1} con H_2O bidestilada.

La mezcla de reacción estuvo sujeta a un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C, seguida por 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 1 min. a 72°C y una extensión final de 7 min. a 72°C, en un termociclador. Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 V por 1 hr en solución amortiguadora TAE 1X (40 mM Tris- HCl, 2 mM ácido acético, 1 mM EDTA), el gel se tiñó

con bromuro de etídio (5 μg/ml). Las bandas de DNA se visualizaron con luz UV y se fotografiaron. Se usó como marcador de peso molecular a φX174/Hae III.

Los productos de PCR se purificaron con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se secuenciaron los productos amplificados con los oligonucleótidos según fuese el caso, en el equipo ABI PRISM 3100 (Perkin-Elmer División, Applied Biosystems), por medio del método Sanger con Big-Dye Terminator Kit. Los alineamientos múltiples de nucleótidos se efectuaron en los programas Clustal X 2.0 y Bioedit v7.0.9, y se realizó un análisis por Blastn.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Oligonucleótido Ð	**Secuencia (5´- 3´)**	**Gen**	**Tamaño de amplificación (bp)**
KmtnC-F	CCG CCG ACC TTA TCA CTA C	mtnC	340
KmtnC-R	GCA TGG CCC AGG TGT TCA G		
KV770-F	TCC CGA GGT TCA CAT TTC C	Fosfoglicerato mutasa	449
KV770-R	AGC GGG TGA ACG TCG ATA C		
KV1000- F	CTG GGA TGT GGC AAT GGT G	Tiopurina metiltransferasa	438
KV1000- R	AAA CTG CGC CTG CTG TAT C		
KV1615-F	ACA CAA CAT TTC AGG CGG CT	N-acetil transferasa	499
KV1615-R	GGG CGT GGC TTT TTT CAT CG		
KV2602-F	CTC CTG TCC ACC GTA TTT AT	Fimbria	350
KV2602- R	TCA TTC GCC GTC ACC AAC AAA		
KP878-F	ACC GAT AAC CAG CCT GAC TT	Transferasa	878
KP878-R	CTT TCT TCT GCC CAC TGT TG		
KP888-F	AAG CAA GCC AGA ACA GAA AG	Hidrolasa	888
KP888-R	ACT TCG GTT TTA TCC AGG TC		

Ð Los oligonucleótidos fueron diseñados para este estudio.

Validación de sondas moleculares y determinación de condiciones para PCR-multiplex

Para comprobar que los oligonucleótidos amplificaran los genes seleccionados, estos fueron validados inicialmente mediante PCR-single (condiciones ver materiales y métodos). En la figura 10, se observa la validación de los genes únicos de *K. variicola* (Figura 10A y 10B) y los específicos de *K. pneumoniae* (Figura 11). Esta validación se realizó incluyendo los genomas de cepas controles como *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. variicola* R801, *R. planticola* ATCC 33531, *R. terrigena* ATCC 33257 y un aislamiento clínico de *K. oxytoca* 5600. Se incluyeron los oligonucleótidos del gen *rpoB* como control de amplificación.

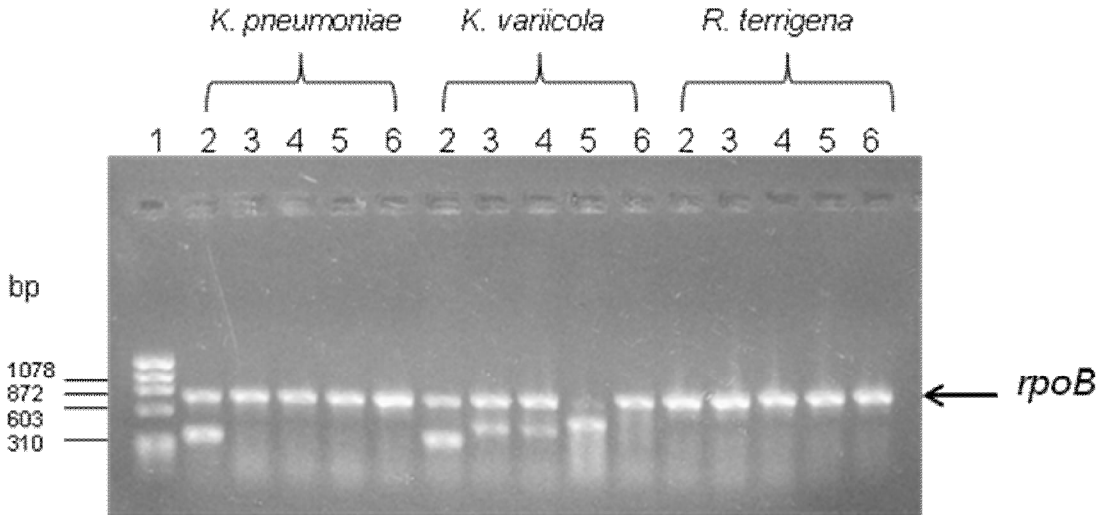


Figura 10A. Validación de sondas de *K. variicola*. Carril 1 Marcador de PM φX174/Hae III, Carril 2 oligonucleótidos KmtnC-F y R, Carril 3 oligonucleótidos KV770-F y R, Carril 4 oligonucleótidos KV1000- F y R, Carril 5 oligonucleótidos KV1615- F y R, Carril 6 oligonucleótidos KV2602- F y R. Productos de PCR obtenidos con electroforesis en gel de agarosa 1%.

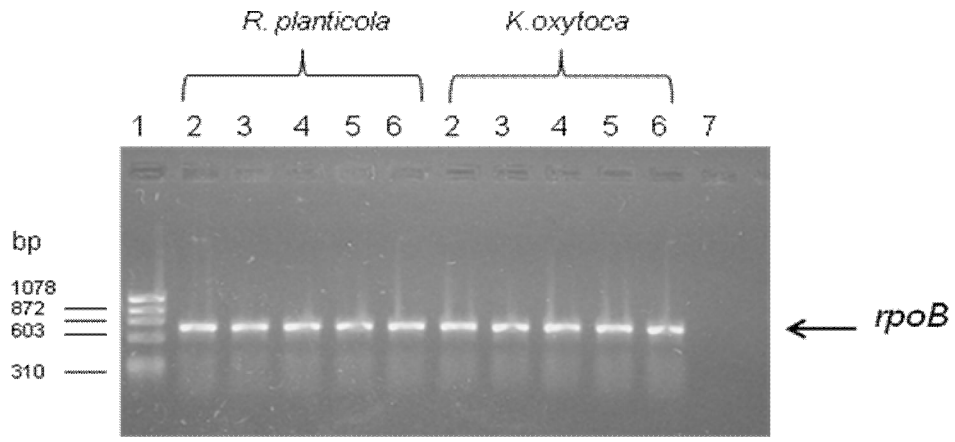


Figura 10B. Validación de sondas de *K. variicola*. Carril 1 Marcador de PM φX174/Hae III, Carril 2 oligonucleótidos KmtnC-F y R, Carril 3 oligonucleótidos KV770-F y R, Carril 4 oligonucleótidos KV1000- F y R, Carril 5 oligonucleótidos KV1615- F y R, Carril 6 oligonucleótidos KV2602- F y R. Carril 7 control negativo (sin DNA). Productos de PCR obtenidos con electroforesis en gel de agarosa 1%.

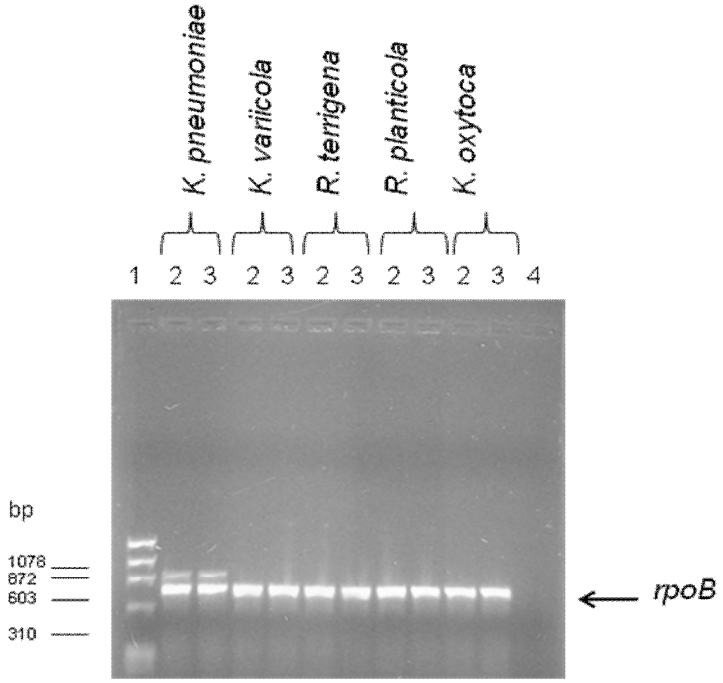


Figura 11. Validación de sondas de *K. pneumoniae*. Carril 1 Marcador de PM φX174/Hae III, Carril 2 oligonucleótidos KP878- F y R, Carril 3 oligonucleótidos KP888- F y R, Carril 4 control negativo (sin DNA). Productos de PCR obtenidos con electroforesis en gel de agarosa 1%.

Las sondas de *K. variicola* únicamente amplificaron utilizando el DNA de *K. variicola*; así mismo las sondas diseñadas para *K. pneumoniae* únicamente amplificaron utilizando el DNA de *K. pneumoniae*, y las sondas del gen *mtnC* fueron específicos y amplificaron el DNA de *K. variicola* y *K. pneumoniae.*

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de las amplificaciones por PCR de los marcadores moleculares de *K. variicola*, *K. pneumoniae* así como el gen *mtnC* confirman que el gen amplificado corresponde a los marcadores propuestos (ver materiales y métodos).

La sonda conformada por los oligonucleótidos KV2602- F y R de *K. variicola* no amplificó a esta temperatura, por lo que la sonda fue eliminada del estudio, limitándolo a tres sondas de *K. variicola* y dos sondas de *K. pneumoniae*.

PCR-multiplex

Posterior a la validación de los oligonucleótidos, por PCR-single se determinaron las condiciones para un PCR-multiplex, este se llevó a cabo a una Tm de 60°C, se utilizó una mezcla de DNA de *K. variicola* R801 y *K. pneumoniae* ATCC 13883 como control positivo. Inicialmente se utilizaron oligonucleótidos a una concentración de 5 pmol por reacción (Figura 12A), sin embargo la banda que corresponde a *K. pneumoniae* de aproximadamente 800 bp no amplificó, por lo que se consideró variar la concentración de los oligonucleótidos. Se analizaron tres combinaciones de oligonucleótidos:5 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. pneumoniae*, *K. variicola* y el género *Klebsiella*; 20 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. pneumoniae*, y 5 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. variicola* y el género *Klebsiella*; y 25 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. pneumoniae*, y 5 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. variicola* y el género *Klebsiella*; las concentraciones fueron modificadas hasta lograr que las tres bandas del PCR multiplex fueran visiblemente notables, por lo que las concentraciones equimolares de oligonucleótidos ideales fueron 25 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. pneumoniae*, y 5 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K.*

variicola y el género *Klebsiella*, teniendo como resultado la relación equimolar 5:1:1 (Figura 12B).

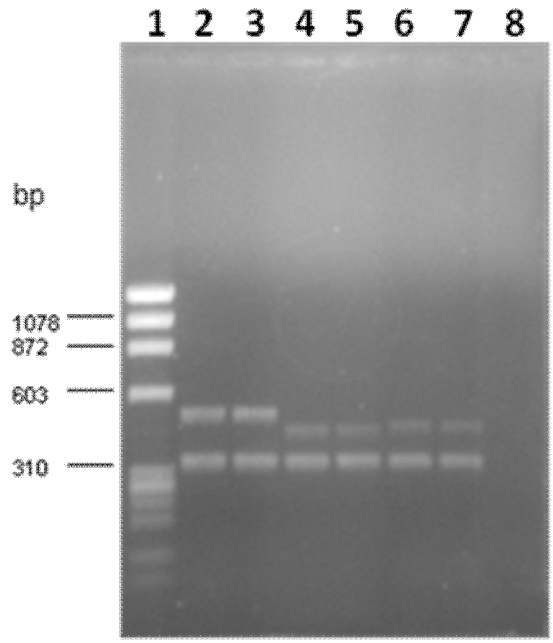


Figura 12A. Determinación de condiciones para un PCR-multiplex. Carril 1 Marcador de PM φX174/Hae III, Carril 2 oligonucleótidos KV1615- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R; Carril 3 oligonucleótidos KV1615- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R; Carril 4 oligonucleótidos KV1000- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R; Carril 5 oligonucleótidos KV1000- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R; Carril 6 oligonucleótidos KV770-F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R; Carril 7 oligonucleótidos KV770-F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R; Carril 8 control negativo (sin DNA). Concentración de oligonucleótidos 5 pmol/ reacción. Productos de PCR obtenidos con electroforesis en gel de agarosa 1%.

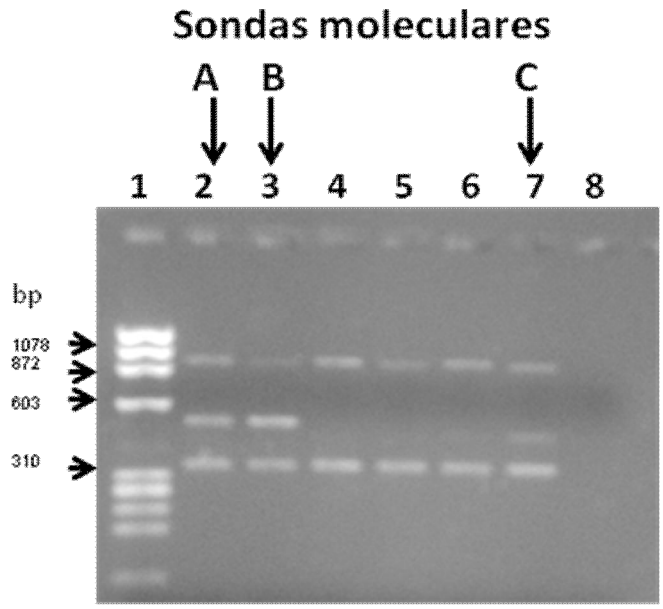


Figura 12B. Determinación de condiciones para la amplificación de sondas moleculares. Relación equimolar 5:1:1.Carril 1 Marcador de PM φX174/Hae III, Carril 2 oligonucleótidos KV1615- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R; Carril 3 oligonucleótidos KV1615- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R; Carril 4 oligonucleótidos KV1000- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R; Carril 5 oligonucleótidos KV1000- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R; Carril 6 oligonucleótidos KV770-F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R; Carril 7 oligonucleótidos KV770-F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R; Carril 8 control negativo (sin DNA). Concentración de oligonucleótidos 25 pmol/ reacción de *K. pneumoniae* y 5 pmol/ reacción de *K. variicola* y el género *Klebsiella*. Productos de PCR obtenidos con electroforesis en gel de agarosa 1%.

Utilizando una relación equimolar 5:1:1 (25 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. pneumoniae*, y 5 pmol/ reacción de los oligonucleótidos de *K. variicola* y el género *Klebsiella*) las sondas moleculares propuestas son las combinaciones: KV1615, KP878 y KmtnC (Sonda A); KV1615, KP888 y KmtnC (Sonda B); y KV770, KP888 y KmtnC (Sonda C) (Figura 12B).

A fin de ampliar el número de marcadores moleculares posibles, se determinaron las condiciones de amplificación óptima de los oligonucleótidos restantes. Las concentraciones de oligonucleótidos se modificaron a fin de que amplificaran las tres bandas esperadas por PCR-multiplex, los oligonucleótidos utilizados fueron KV1000-F y R, KV770-F y R, KP878-F y R, y KP888-F y R. Las concentraciones de oligonucleótidos

utilizadas fueron 5 pmol/ reacción de *K. pneumoniae*, 1 pmol/ reacción y 0.7 pmol/ reacción de *K. variicola* y 0.2 pmol/ reacción del género *Klebsiella*. En la figura 13 se muestra las amplificaciones de las concentraciones de oligonucleótidos empleadas.

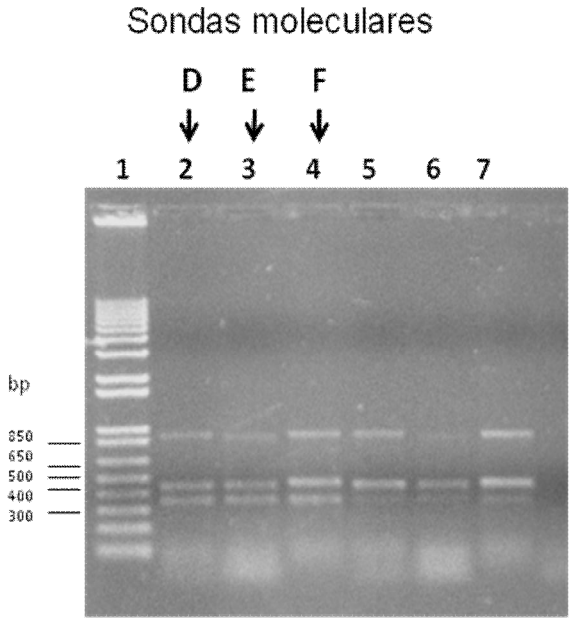


Figura 13. Determinación de condiciones para la amplificación de sondas moleculares. Carril 1 Marcador de PM 1 Kb; Carriles 2 y 5 oligonucleótidos KV1000- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R; Carriles 3 y 6 oligonucleótidos KV1000- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R; Carriles 4 y 7 oligonucleótidos KV770- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R. Concentración de oligonucleótidos 5 pmol/ reacción de *K. pneumoniae*, 1 pmol/ reacción de *K. variicola* y 0.2 pmol/ reacción del género *Klebsiella*. (Carriles 2, 3 y 4); 5 pmol/ reacción de *K. pneumoniae*, 0.7 pmol/ reacción de *K. variicola* y 0.2 pmol/ reacción del género *Klebsiella*. (Carriles 5, 6 y 7). Productos de PCR obtenidos con electroforesis en gel de agarosa 1%.

Utilizando las concentraciones 5 pmol/ reacción de *K. pneumoniae*, 1 pmol/ reacción de *K. variicola* y 0.2 pmol/ reacción del género *Klebsiella* las tres bandas del PCR-multiplex esperadas fueron visiblemente notables, por lo que las combinaciones de oligonucleótidos a esas concentraciones se designaron Sonda D (oligonucleótidos

KV1000- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R), Sonda E (oligonucleótidos KV1000- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R) y Sonda F (oligonucleótidos KV770- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R).

La amplificación por PCR-multiplex de los genes específicos de *K. variicola*, *K. pneumoniae* y el género *Klebsiella* es posible mediante la utilización de dos condiciones de PCR-multiplex, cada una de estas condiciones consiste en tres sondas moleculares para la identificación y diferenciación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* (Tabla 8).

Tabla 8. Sondas moleculares para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae*.

Condición	**Sonda molecular**	**Oligonucleótidos Ð**		
		K. variicola	***K. pneumoniae***	**Género *Klebsiella***
1	A	KV1615-F y R	KP878- F y R	KmtnC- F y R
	B	KV1615-F y R	KP888- F y R	KmtnC- F y R
	C	KV770-F y R	KP888- F y R	KmtnC- F y R
2	D	KV1000-F y R	KP888- F y R	KmtnC- F y R
	E	KV1000-F y R	KP888- F y R	KmtnC- F y R
	F	KV770-F y R	KP878- F y R	KmtnC- F y R

Ð Las concentraciones de oligonucleótidos empleadas son: Condición 1: 25 pmol/ reacción de *K. pneumoniae*, 5 pmol/ reacción de *K. variicola* y género *Klebsiella*; Condición 2: 25 pmol/ reacción de *K. pneumoniae*, 5 pmol/ reacción de *K. variicola* y 1 pmol/ reacción del género *Klebsiella.*

Determinación de prevalencia de *K. pneumoniae* y *K. variicola* en aislamientos clínicos

El análisis por PCR-multiplex se realizó a 190 aislamientos clínicos, 184 aislamientos provenientes de la República Mexicana y siete aislamientos provenientes de Colombia, estos fueron aislados entre 1990 hasta 2009, en el proyecto participaron 20

hospitales; los aislamientos provenían de grupos clonales distintos, y estos representan a otros 499 aislamientos clínicos (Tabla 4). Los aislamientos clínicos analizados estaban previamente identificados como *K. pneumoniae* por medio de MicroScan y API 20E.

Se seleccionaron aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola* que ya habían sido reportados en publicaciones anteriores. Estos corresponden a 40 de los aislamientos analizados, 34 corresponden a *K. pneumoniae* identificados por API-20E y MicroScan y seis de ellos ya habían sido descritos como *K. variicola* o *K. pneumoniae* en base a análisis filogenéticos de los genes housekeeping (Rosenblueth *et al.* 2004). Por lo que en el estudio se incluyeron otros 185 aislamientos clínicos identificados como *K. pneumoniae* que no habían sido reportados previamente.

Utilizando las sondas moleculares propuestas se analizaron los aislamientos clínicos que ya habían sido identificados previamente como *K. pneumoniae* o *K. variicola* y aislamientos clínicos reportados como *K. pneumoniae* solo por métodos bioquímicos. Mediante el PCR-multiplex se permitió identificar correctamente a los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola* que ya habían sido previamente clasificados.

En los aislamientos que habían sido reportados como *K. pneumoniae* bioquímicamente, se encontró sólo un aislamiento que pertenece a la especie *K. variicola*. Se encontró que de los 190 aislamientos clínicos, 185 de ellos pertenecen a la especie *K. pneumoniae*, mientras que cinco de ellos pertenecen a la especie *K. variicola* (en estos están incluidos los aislamientos reportados por Rosenblueth (2004)), por lo que la prevalencia de *K. variicola* es del 2.6%, y la prevalencia de *K. pneumoniae* es del 97.4% en un total de 190 aislamientos clínicos analizados (Tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia de *K. variicola* y *K. pneumoniae.*

Especie	**No. Aislamientos**		**Total**	**Prevalencia (%)**
	Ya reportados	**Nuevos**		
K. pneumoniae	2	183	185	97.4
K. variicola	4	1	5	2.6
Total	**6**	**184**	**190**	**100**

Los cinco aislamientos identificados como *K. variicola* fueron sometidos a un análisis por MicroScan para conocer la susceptibilidad que presentan a distintos antibióticos, así como a un análisis para determinar si los aislamientos clínicos presentan alguna BLEE (Tabla 10).

El análisis mostró que tres de cinco aislamientos presentan alguna BLEE y por lo tanto presentan una resistencia a antimicrobianos β- lactámicos. Los aislamientos provienen de estados geográficamente distantes y fueron aislados en años distintos (Tabla 10).

Tabla 10. Características de los aislamientos de *K. variicola*.

Cepa	Hospital ¤	EstadoĐ	Año	Origen	BLEE	Susceptibilidad antimicrobiana §							
						AMP	AK	AZT	CTX	CAZ	GEN	CIP	FEP
806*	1	A	1996	Hemocultivo	TEM / SHV	R	R	S	R	S	R	S	S
1109	2	B	1996	Hemocultivo	-	R	S	S	S	S	S	S	S
1171	2	B	1998	Catéter	-	R	S	S	S	S	S	S	S
1258	2	B	1999	Hemocultivo	TEM / CTX	R	R	R	R	R	R	S	R
06-268	3	C	2007	Absceso	CTX M- 15/ SHV- 12	R	S	R	R	R	S	R	R

* Corresponde a un brote intrahospitalario.

¤ 1- Hospital del Niño de Tabasco; 2-Hospital del Niño Morelense; 3- Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas.

Đ A- Tabasco; B- Morelos; C- Nuevo León.

§ AMP- Ampicilina; AK- Amikacina; AZT- Aztreonam; CTX- Cefotaxima; CAZ- Ceftazidima; GEN- Gentamicina; CIP- Ciprofloxacina; FEP- Cefepime. S: Sensible; R: Resistente

Se realizó un ensayo adicional en aislamientos ambientales de *K. variicola* (Rosenblueth *et al*. 2004) a fin de comprobar la sensibilidad de las sondas moleculares. Se utilizaron las tres sondas A, B y C, en la amplificación utilizando DNA de los aislamientos ambientales: 6A2 (plátano), VI (plátano), T29A (caña de azúcar) y F2R9 (plátano) (Figura 14).

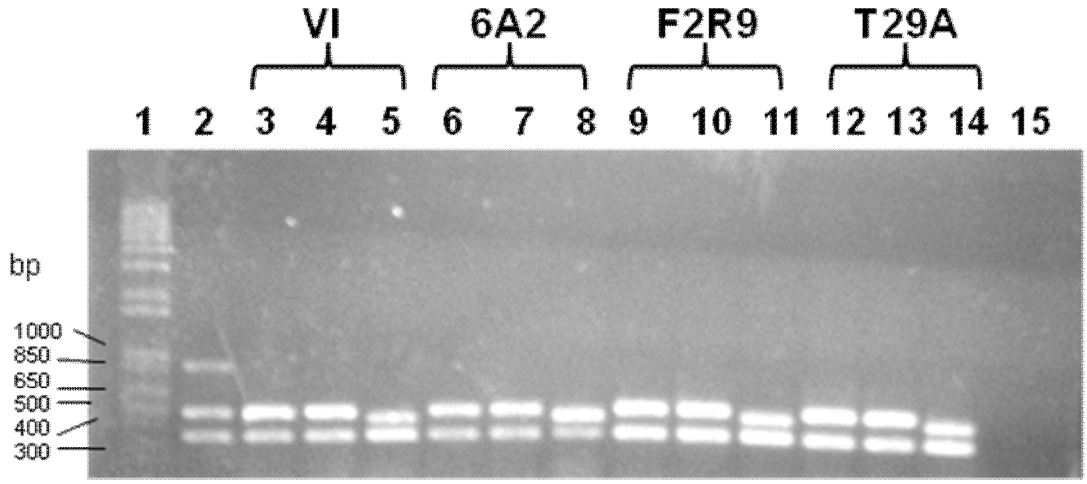


Figura 14. Análisis de aislamientos ambientales por PCR-multiplex utilizando las sondas moleculares A, B y C. Carril 1 Marcador de PM 1Kb; Carril 2: Control positivo [Sonda A (oligonucleótidos KV1615- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R), mezcla de DNA de *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *K. variicola* R801]; Carriles 3, 6, 9 y 12: Sonda molecular A (oligonucleótidos KV1615- F y R, KP878- F y R, KmtnC- F y R), Carriles 4, 7, 10 y 13: Sonda molecular B (oligonucleótidos KV1615- F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R), Carriles 5, 8, 11 y 14: Sonda molecular C (oligonucleótidos KV770-F y R, KP888- F y R, KmtnC- F y R). En los carriles 3, 4 y 5 se utilizó el DNA de VI, en los carriles 6,7 y 8 se utilizó el DNA de 6A2, en los carriles 9, 10 y 11 se utilizó el DNA de F2R9, en los carriles 12, 13 y 14 se utilizó el DNA de T29A. Carril 15: Control negativo (sin DNA). Productos de PCR obtenidos con electroforesis en gel de agarosa 1%.

Adicionalmente se seleccionaron los aislamientos de *K. variicola*, incluyendo los aislamientos ambientales y clínicos de *K. pneumoniae*, para el análisis de los genes *gyrA* y *rpoB*. En total se analizaron nueve cepas de *K. variicola* y ocho aislamientos de *K. pneumoniae*, incluyendo los controles *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *K. variicola* R801. El análisis filogenéticos mediante Neighbour-Joining, de las secuencias indica que los aislamientos identificados mediante PCR-multiplex con las sondas A, B y C corresponden

a *K. pneumoniae* (los aislamientos clínicos 55, 1322, 1578, 1621, 2444, 2992, 5817, 01-284, 04-219) y *K. variicola* (los aislamientos clínicos 806, 1109, 1171, 1258, 06-268, VI, 6A2, F2R9, T29A) respectivamente (Figura 15A y 15B).

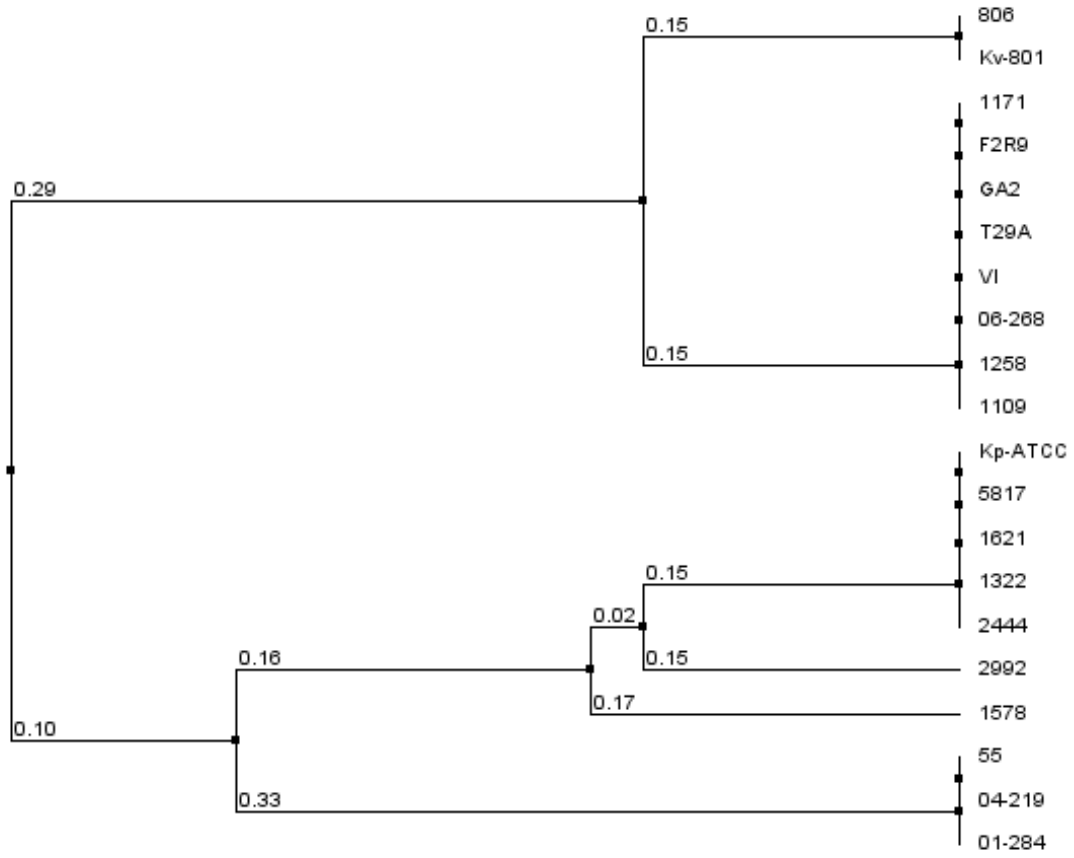


Figura 15A. Análisis filogenético del gen *gyrA*. Controles: *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Kp-ATCC) y *K. variicola* R801 (Kv-801). Aislamientos identificados como *K. pneumoniae*: 55,1322, 1578, 1621, 2444, 2992, 01-284, 04-219. Aislamientos identificados como *K. variicola*: 806, 1109, 1171, 1258, 06-268, VI, 6A2, F2R9, T29A.

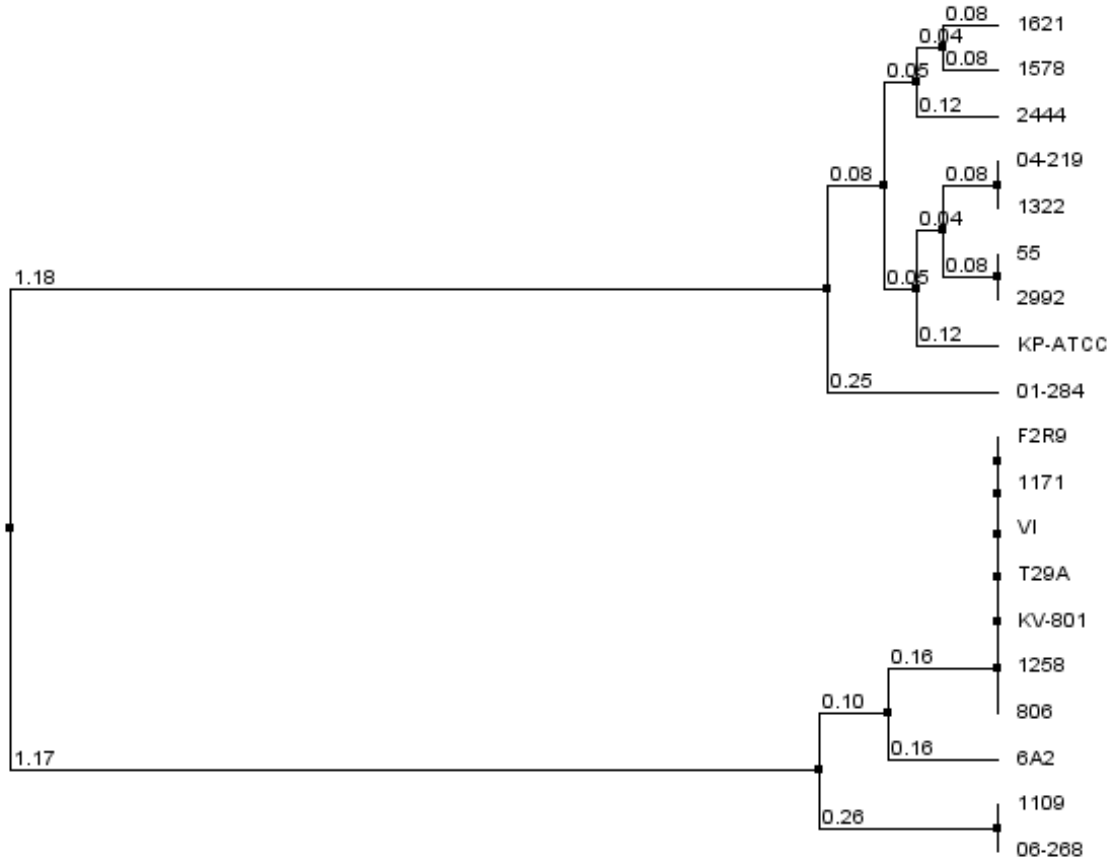


Figura 15B. Análisis filogenético de *rpoB*. Controles: *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Kp-ATCC) y *K. variicola* R801 (Kv-801). Aislamientos identificados como *K. pneumoniae*: 55, 1322, 1578, 1621, 2444, 2992, 01-284, 04-219. Aislamientos identificados como *K. variicola*: 806, 1109, 1171, 1258, 06-268, VI, 6A2, F2R9, T29A.

Discusión

Los aislamientos ambientales como clínicos de *K. variicola* y *K. pneumoniae* poseen características fenotípicas y bioquímicas muy similares. Debido a esta circunstancia, actualmente no es posible su diferenciación por métodos bioquímicos convencionales o automatizados. *K. variicola* ha sido identificada como una especie endófita, simbionte de invertebrados y patógena en humanos, sin embargo se desconoce su papel en la naturaleza y en los hospitales. *K. variicola* fue identificada por medio de

estrategias moleculares basadas en análisis filogenéticos de genes housekeeping, no obstante estos análisis son costosos y requieren personal especializado. En este trabajo se desarrolló un método basado en PCR-multiplex que permite diferenciar a *K. variicola* de *K. pneumoniae*. Esta prueba molecular se desarrolló mediante la comparación de los genomas de *K. variicola* y *K. pneumoniae*, con la finalidad de identificar genes únicos de cada especie y utilizarlos como marcadores moleculares que permitieran la identificación de *K. variicola* entre una colección de aislamientos clínicos identificados como *K. pneumoniae*.

En los últimos años debido al desarrollo de sistemas de secuenciación masiva se determinó la secuencia del genoma humano por dos grupos de investigación (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter *et al*. 2001), dicho proyecto surgió de la secuenciación de pequeños genomas como el del virus φX174 en 1977, siendo el primer genoma secuenciado (Primrase y Twyman, 2003) y el genoma de *Haemophilus influenzae* en 1995 (Fleischmann *et al.* 1995). Posterior a la secuenciación del genoma humano más de 30 genomas bacterianos, así como los genomas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Arabidopsis thaliana* fueron secuenciados (Primrase y Twyman, 2003) con el propósito de obtener suficiente información que permitiera un análisis sistemático de las características genéticas, por lo que la secuenciación de genomas se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada y cada vez son más los genomas secuenciados que se encuentran disponibles (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome).

K. pneumoniae, grupos filogenéticos y microarreglos.

Previo a la secuenciación de genomas de *K. pneumoniae*, se realizaron análisis de diversos aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*; como el análisis filogenético de los genes *gyrA* y *parC* de *K. pneumoniae* identificando tres grupos filogenéticos diferentes, denominados KpI, KpII y KpIII, siendo el grupo KpI el mayoritario, es de notar que a pesar de que existan estas diferencias, las características fenotípicas de *K. pneumoniae* no cambian y únicamente es posible identificar estas diferencias entre los aislamientos mediante la secuenciación de estos genes (Brisse *et al.* 2004).

Adicionalmente, mediante el análisis de microarreglos de los genomas de *E. coli* y *K. pneumoniae* 342 y entre diferentes aislamientos de *K. pneumoniae*; utilizando como sonda el genoma de K. pneumoniae 342 se identificaron 3,000 genes que estaban presentes tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae* y 1,030 genes que se encontraban únicamente en *E. coli* (Dong *et al.* 2001). La ventaja de esta herramienta es que permite identificar una gran cantidad de genes en un organismo sin que estos sean secuenciados, por el contrario estos estudio son únicamente descriptivos. El análisis reveló que estos genes están presentes en ambas especies así como aquellos genes que están contenidos únicamente en *E. coli* K-12; sin embargo no pudieron ser determinados los genes únicos de *K. pneumoniae* 342, por lo que es necesario llevar a cabo un análisis en que sean comparados ambos genomas y determinar genes presentes únicamente en *K. pneumoniae* 342.

Comparación de genomas de *K. pneumoniae*

Recientemente fue determinada la secuencia de varios genomas de *K. pneumoniae*, tanto de aislamientos clínicos y ambientales. El genoma de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 fue publicado en el 2010, el cual fue comparado con el genoma de *K. pneumoniae* MGH78578 (McClelland *et al*. 2007, sin publicar). En la secuenciación y análisis del genoma de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 se encontraron genes que eran únicos de cada uno de los genomas, como: genes para la síntesis de yersiniabactina, genes asociados a la virulencia, reguladores del fenotipo mucoide, genes del sistema de secreción tipo IV, entre otros (Wu *et al.* 2009). Sin embargo, algunos de los genes analizados se encuentran en elementos conjugativos y otros su presencia se atribuye a eventos de inserción por fagos. En cualquiera de los dos eventos los genes pueden ser adquiridos por transferencia horizontal de material genético, por lo que estos genes no pueden ser considerados como genes específicos de *K. pneumoniae* debido a que puede haber variación entre una cepa y otra de la misma especie.

Así mismo, en la publicación del genoma de *K. pneumoniae* 342 se realizaron comparaciones con *K. pneumoniae* MGH78578 y *E. coli* K-12. En el estudio se encontró que los genomas de *K. pneumoniae* 342 y *K. pneumoniae* MGH78578 tenían un promedio

de identidad del 96% y compartían 4,205 proteínas. Al ser comparadas con el genoma de *E. coli* K-12 se encontraron 1,315 proteínas que no estaban en *E. coli* (proteínas especificas de *Klebsiella*) (Figura 13) (Fouts *et al*. 2008). Adicionalmente se identificaron 110 proteínas compartidas entre *K. pneumoniae* 342 y *E. coli* K-12 (no presentes en *K. pneumoniae* MGH78578) y 60 proteínas que compartían *K. pneumoniae* MGH78578 y *E. coli* K-12 (no presentes en *K. pneumoniae* 342). Un total de 1,107 proteínas fueron identificadas exclusivamente en *K. pneumoniae* 342 (no identificadas en *K. pneumoniae* MGH78578 o en *E. coli* K-12) y 507 proteínas se identificaron exclusivamente en *K. pneumoniae* MGH 78578 (Figura 13) (Fouts *et al*. 2008).

*

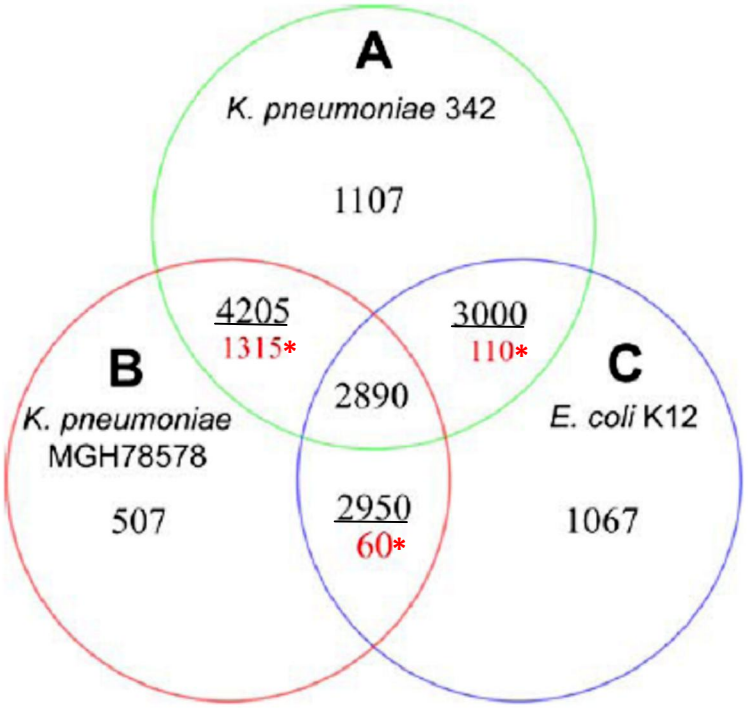


Figura 13. Comparación de proteínas de los genomas de *K. pneumoniae* 342, *K. pneumoniae* MGH78578 y *E. coli* K-12. El diagrama de Venn muestra el número de proteínas compartidas (negro y subrayadas) o proteínas únicas (rojo y con asterisco (*****)) (Fouts *et al*. 2008).

En este análisis al comparar a *K. pneumoniae* MGH78578 y *K. pneumoniae* 342 se encontraron diferencias significativas entre ambos aislamientos, en el reporte se concluyó que estas diferencias podrían ser resultado de la adquisición de genes necesarios para la colonización del ambiente en el que fueron aisladas y así como del hospedero (*K.*

pneumoniae 342 como endófito y *K. pneumoniae* MGH78578 como patógeno humano) (Fouts *et al*. 2008), en dicho reporte no se consideró que *K. pneumoniae* 342 pertenece a la especie *K. variicola.*

Al momento del inicio del desarrollo de este estudio contamos con la secuencia de los genomas de dos aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (Kp_NTUH-K2044 y Kp_MGH78578) y de tres aislamientos ambientales de *K. variicola* (Kp_342, At-22 y Kv_801). La comparación entre los aislamientos de *K. pneumoniae* y *K. variicola*, permitió identificar 117 genes únicos de *K. variicola* y 63 genes únicos de *K. pneumoniae*, y el número de genes únicos tanto de *K. pneumoniae* como *K. variicola* es menor, si lo comparamos con los identificados en el estudio de Fouts *et al*. (2008), en el cual se identificaron 1,107 genes exclusivos de *K. pneumoniae* 342 y 507 genes exclusivos de *K. pneumoniae* MGH78578, considerando que *K. pneumoniae* 342 pertenece a *K. variicola*.

El número de genes exclusivos de *K. variicola* y *K. pneumoniae* varia debido a que en el análisis reportado por Fouts *et al*. (2008) únicamente son comparados los genomas de *K. pneumoniae* MGH78578 y *K. pneumoniae* 342, por el contrario en nuestro estudio son comparados tres genomas de *K. variicola* (Kv_801, Kv_At-22 y Kp_342) y dos genomas de *K. pneumoniae* (Kp_MGH78578 y Kp_NTUH-K2044), por lo que el número de genes comparados es superior y los genes seleccionados debían estar incluidos en todos los genomas de *K. variicola* o *K. pneumoniae*.

Tomando en cuenta de que las cepas de *K. variicola* y *K. pneumoniae* provenían de diferentes ambientes (patógena en humanos (Kp_MGH78578, Kp_NTUH-K2044 y Kv_801) y/o plantas (Kp_342 y Kv_At-22)), los genomas podían contener genes que son requeridos para la colonización en cada uno de los ambientes y estos podían no estar en todos los genomas de una misma especie. Estos genes no son considerados genes exclusivos de la especie.

Así como los genomas han sido comparados, el desarrollo de técnicas bioquímicas que permita diferenciar a *K. variicola* de *K. pneumoniae* ha sido abordado.

En un estudio realizado por Alves *et al*. (2006) trató de implementar un test de pruebas bioquímicas para la identificación de especies incluyendo la prueba del uso de adonitol como fuente de carbono como posible prueba de identificación de *K. variicola* entre aislamientos de *K. pneumoniae* (Rosenblueth *et al.* 2004) Sin embargo, la prueba

del adonitol resultó variable en ambas especies por lo que actualmente no se ha determinado una prueba bioquímica para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* (Alves *et al.* 2006).

Así mismo, un estudio realizado por Van-Veen *et al*. (2010) reportó la identificación de géneros y especies bacterianas por medio de espectrometría de masas. En el estudio se incluyeron microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos no fermentativos, levaduras y enterobacterias, incluyendo a *K. pneumoniae* y *K. variicola*. Sin embargo, mediante esta herramienta no fue posible la identificación de *K. variicola* en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*. Aunque esta técnica molecular tiene una gran especificidad aun tienen un margen de error por lo que no pueden ser utilizadas en la identificación de *K. variicola*.

La problemática de la identificación de especies dentro de un género bacteriano no es un problema específico de *K. pneumoniae* y *K. variicola*, también con otros microorganismos se han hecho esfuerzos en la optimización de un método de identificación de especies altamente relacionadas. Mediante el uso de herramientas moleculares se han desarrollado pruebas para la identificación de especies, como es el caso del género *Salmonella* (Soumet *et al*. 1999a, Soumet *et al*. 1999b; Grimont *et al*. 2000).

Un estudio reportado por Malkawi y Gharaibeh (2004), consistió en el desarrollo y estandarización de las condiciones de un PCR-multiplex para la identificación de *S. enteritidis* serotipo *enteritidis* y serotipo *typhimurium* en alimentos contaminados. El método consiste en la amplificación de dos secuencias de DNA de genes que codifican proteínas fimbriales y de una secuencia de DNA que codifica una proteína que es parte del Sistema de Secreción tipo III para la identificación del género *Salmonella*. Las proteínas estudiadas han sido previamente identificadas en el género *Salmonella* spp. y son especificas de los serotipos *enteritidis* o *typhimurium* (Soumet *et al*. 1999a, Soumet *et al*. 1999b; Grimont *et al*. 2000). Por el contrario, en *Klebsiella* spp. las proteínas fimbriales varían de una cepa a otra (Brisse *et al*. 2006) por lo que el uso de estas proteínas para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* no es factible.

Identificación de marcadores moleculares (sondas moleculares) y determinación de prevalencia de *K. variicola* y *K. pneumoniae*

La selección de los posibles marcadores con el fin de encontrar genes exclusivos de *K. variicola* y *K. pneumoniae* se llevó a cabo mediante diversos filtros basados en herramientas bioinformáticas. Durante el análisis fueron eliminados los genes que estaban contenidos en otros microorganismos debido a que se buscaban genes únicos de *K. variicola* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, algunos de estos genes pudieron haber sido utilizados en la selección debido que los aislamientos sometidos a PCR-multiplex utilizando los marcadores moleculares propuestos en este estudio han sido previamente identificados por medio de pruebas bioquímicas convencionales o automatizadas como *K. pneumoniae*, por lo que se tiene la seguridad de que la cepa pertenece a esta especie.

Por medio del análisis comparativo de los genomas se obtuvieron genes únicos de *K. pneumoniae* y *K. variicola*; el primer análisis consistió en la selección de genes que estuvieran compartidos en los genomas de *K. variicola* (*K. pneumoniae* 342, *K. variicola* At-22 y 801) y genes compartidos en los genomas de *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* MGH78578 y NTUH-K2044).

Posteriormente estos genes compartidos en cada especie fueron comparados con la otra especie, es decir genes de *K. pneumoniae* versus genes de *K. variicola* y viceversa, a fin de eliminar aquellos genes que estuvieran presentes o compartidos en ambas especies para finalmente identificar genes ñúnicosò de *K. pneumoniae* y *K. variicola*.

Se seleccionaron cuatro genes únicos de *K. variicola* y dos genes únicos de *K. pneumoniae*. Los genes únicos identificados correspondieron a diversas funciones y fueron catalogadas como proteínas únicas de las especies. Los genes que se seleccionaron codifican para proteínas involucradas en el metabolismo y en la estructura celular, para emplearlos como posibles marcadores moleculares en cada especie (debido a que son proteínas conservadas).

Las sondas utilizadas para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* pertenecen a genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo bacteriano.

Estas sondas en *K. variicola* corresponden funcionalmente a: fosfoglicerato mutasa (KV770), tiopurina metil-transferasa (KV1000) y N-acetil transferasa (KV1615); en *K. pneumoniae* corresponden a una transferasa (KP878) y a una hidrolasa (KP888). Debido a que las proteínas involucradas en el metabolismo son conservadas, estas pueden mantenerse sin cambios aparentes en un organismo determinado por lo que estos genes son considerados marcadores ideales de una especie bacteriana.

El gen *mtnC* fue utilizado como marcador del género *Klebsiella*, el gen codifica una proteína que participa en la vía de salvamento de la metionina. Se tomó en cuenta el análisis llevado a cabo por Wu *et al*. (2009) el cual reportó que el gen *mtnC* únicamente está contenido en *K. pneumoniae/K. variicola*. No obstante, se realizó un análisis utilizando blastn en la base de datos del GenBank. Este análisis determinó que el gen *mtnC* se encuentra contenido en Kp_MGH78578, Kp_NTUH-K2044, Kv_At22 y Kp_342 (100% identidad), así como en *K. oxytoca* y *E. cloacae*. Sin embargo, los genes *mtnC* de *K. oxytoca* y *E. cloacae* tienen una identidad del 98% y 96% respectivamente, por lo que los oligonucleótidos fueron diseñados a fin de que estos hibridaran únicamente en Kp_MGH78578, Kp_NTUH-K2044, Kv_At-22 y Kp_342 mediante PCR.

El gen *mtnC* es considerado un control de amplificación en el PCR-multiplex debido a que se encuentra tanto en *K. variicola* como en *K. pneumoniae*, por lo que siempre debe haber una amplificación de este gen utilizando el DNA de *K. variicola* o *K. pneumoniae*. Este gen se combina con las seis sondas moleculares para la diferenciación de *K. variicola* y *K. pneumoniae*.

A pesar de que en este estudio se optimizaron las condiciones de amplificación por PCR-multiplex de las sondas moleculares, se requiere la optimización de las condiciones en el laboratorio donde se requiera emplear la técnica debido a que los reactivos así como los aparatos de amplificación varían y esto puede incidir sobre la amplificación de los productos esperados.

Por medio de PCR-multiplex utilizando las sondas moleculares en aislamientos clínicos previamente identificados como *K. pneumoniae*, se determinó una prevalencia de *K. pneumoniae* del 97.4% (185 aislamientos de 190), y una prevalencia del 2.6% de *K. variicola* (5/190). La cantidad de *K. variicola* fue menor a las anteriormente reportadas, en

el 2004 se describieron dos reportes en los cuales se encontró una prevalencia de *K. variicola* del 8% (Rosenblueth *et al*. 2004) y 11% (Brisse *et al*. 2004).

En nuestro estudio se incluyeron únicamente cepas aisladas de hospitales que presentaban una multirresistencia a antimicrobianos y eran agentes causales de infecciones nosocomiales, por lo que el estudio podría tener un sesgo de selección ya que el criterio de exclusión del estudio fue la susceptibilidad antimicrobiana. Por otro lado, en los dos reportes anteriores se incluyeron aislamientos hospitalarios sin haber sido determinada su susceptibilidad antimicrobiana anteriormente (Brisse *et al*. 2004); y el otro estudio incluyó tanto aislamientos clínicos como ambientales, en el cual se encontró un mayor número de cepas de *K. variicola* en aislamientos ambientales que en aislamientos clínicos (Rosenblueth *et al*. 2004).

Aunado al sitio de infección y el estatus de susceptibilidad antimicrobiana, un factor adicional de los dos reportes anteriores fue el número de aislamientos que se incluyeron en el estudio (Brisse *et al*. 2004; Rosenblueth *et al*. 2004), por lo que se podría encontrar una mayor prevalencia de *K. variicola* en estudios donde se incluyan un mayor número de aislamientos y sin tomar en cuenta la susceptibilidad a antibióticos en el inicio del estudio.

En este estudio, los cinco aislamientos identificados como *K. variicola* pertenecen a estados geográficamente distantes (Morelos, Tabasco y Nuevo León). Cuatro de ellos se aislaron en años consecutivos (1996- 1999) y una cepa se aisló en 2007, a pesar de que las cepas incluidas en el estudio fueron aisladas desde 1990 a 2009, desde 1999 hasta 2007 no se identificó ninguna cepa de *K. variicola* dentro de esos años, fue hasta el año 2007 donde se identificó un aislamiento de *K. variicola*. El aislamiento 806 pertenece a un brote intrahospitalario del cual procede la cepa de referencia *K. variicola* 801.

El perfil de susceptibilidad de *K. variicola* mostró que tres de cinco aislamientos presentaban multirresistencia a antimicrobianos y presentaban dos BLEEs (β-lactamasas de espectro extendido) distintas (Tabla 10), la multirresistencia puede estar conferida por BLEEs; las cepas de *K. variicola* presentaron bla_{SHV}, $bla_{CTX\text{-}M}$ y bla_{TEM}, únicamente dos de cinco aislamientos presentaron bla_{SHV}, esto concuerda con el reporte de Haeggman *et al*. (2004) en el que se reporta que bla_{SHV} se encuentra presente cromosomalmente en algunos aislamientos de *K. pneumoniae*. Anteriormente se consideraba que bla_{SHV} era

intrínseca de *K. pneumoniae* (Babini y Livermore, 2000). Estas β- lactamasas pueden ser adquiridas mediante transferencia horizontal de material genético y estar contenidas en plásmidos conjugativos.

Se encontró que dos de los aislamientos de *K. variicola* únicamente presentaban resistencia a ampicilina (aislamientos 1109 y 1171; véase tabla 10), anteriormente reportada como una resistencia intrínseca del género *Klebsiella* (Livermore, 1995; Chaves *et al*. 2001). Estas cepas habían sido identificadas como multirresistentes a antibióticos en el momento de su aislamiento. Se identificaron plásmidos, sin embargo no se corroboró si los genes de resistencia se encontraban en ellos, por lo que estos aislamientos pudieron haber perdido los plásmidos que contienen los genes de resistencia.

En estudios anteriores se reportó que algunos de los aislamientos de *K. variicola* presentaban resistencia a ampicilina, carbenicilina, gentamicina, ceftazidima, piperacilina y ceftriaxona (Brisse *et al*. 2004). En nuestro estudio las cepas de *K. variicola* también presentaban resistencia a amikacina, cefotaxima, ciprofloxacina y cefepime (Tabla 10). Se esperaba una multirresistencia a antimicrobianos en las cepas de *K. variicola* debido a que fueron aisladas en el hospital y eran agentes causales de infecciones nosocomiales. Sin embargo en el estudio anterior reportado por Rosenblueth *et al*. (2004), las cepas identificadas como *K. variicola* presentan resistencia a ampicilina y carbenicilina y solo algunos aislamientos presentan resistencia a gentamicina, por lo que las cepas no son consideradas multirresistentes a antibióticos. Esto podría explicarse por la falta de presión selectiva incidida por los antimicrobianos que recibieron en el ambiente en el que fueron aisladas (plátano, arroz, caña de azúcar y maíz).

La cepa *K. variicola* 801 posee dos plásmidos de los cuales uno se pierde con frecuencia a través de las generaciones a pesar de que los plásmidos poseen genes de resistencia a antimicrobianos. Se llevaron a cabo ensayos de conjugación en el Centro de Ciencias Genómicas y en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública para determinar la frecuencia de pérdida. Se determinó que en 50 generaciones el 17% de las cepas habían perdido el plásmido y en 100 generaciones las cepas sin plásmido era del 31% (Reyes-Prieto 2010).

Se desconoce si la estabilidad de los plásmidos que contienen genes de resistencia a antimicrobianos es menor en *K. variicola* que en *K. pneumoniae*. Esto podría

afectar directamente la colonización y permanencia de ambas especies en el nosocomio y explicar por qué la diseminación de *K. pneumoniae* es mayor que la de *K. variicola* en el ambiente hospitalario.

La utilización de las sondas moleculares propuestas en este estudio es una herramienta eficaz para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae*, ya que el 100% de los aislamientos clínicos fueron identificados correctamente así como las cepas controles incluidas, la veracidad de las sondas moleculares propuestas fue corroborada mediante el análisis filogenético de los genes *rpoB* y *gyrA*, herramienta molecular que fue utilizada para la correcta identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* (Rosenblueth *et al*. 2004). La utilización de las sondas moleculares diseñadas en esta tesis para la identificación de ambas especies es confiable.

A pesar de que en este estudio se optimizaron las condiciones de amplificación por PCR-multiplex de las sondas moleculares, se requiere la optimización de las condiciones en el laboratorio donde se requiera emplear la técnica debido a que los reactivos así como los aparatos de amplificación varían y esto puede incidir sobre la amplificación de los productos esperados.

Hay una mayor prevalencia de *K. variicola* en el ambiente en el cual desempeña un papel importante en la fijación de nitrógeno; tal es el caso de *K. variicola* At-22, cepa aislada de cultivos de hongos de la hormiga cortadora de hojas (género *Atta*) con la que tiene una asociación simbiótica para proveer nitrógeno a los cultivos de hongos. Este hallazgo es de gran importancia ya que se desconocía esta fuente de nitrógeno en ecosistemas neotropicales (Pinto-Tomas *et al*. 2009). *K. variicola* posee la capacidad de fijar nitrógeno, por lo que esta especie podría estar más adaptada para colonizar el ambiente en comparación a las superficies mucosas de mamíferos. Esto podría explicar la prevalencia de las dos especies en el ambiente y en el hospital.

Es importante la correcta identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* ya que se desconoce qué papel están jugando ambas especies en el ambiente y dentro de los hospitales y para determinar si existen diferencias significativas epidemiológicas y patogénicas entre *K. variicola* y *K. pneumoniae*.

Conclusiones:

Debido al gran parecido que existe entre *K. variicola* y *K. pneumoniae*, y a los diferentes intentos fallidos por poder diferenciarlas, en este estudio se desarrolló un PCR-multiplex que permite mediante marcadores moleculares de genes únicos de *K. variicola* y *K. pneumoniae* diferenciar ambas especies.

Las sondas moleculares pertenecen a genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo y estructura celular de *K. variicola* y *K. pneumoniae*; el marcador molecular del género *Klebsiella*, el gen *mtnC*, se encuentra presente en ambas especies, por lo que se aprovechó de esta característica como sonda molecular para distinguir ambas especies.

Se determinó una prevalencia de *K. pneumoniae* del 97.4% (185 aislamientos) y una prevalencia de *K. variicola* del 2.6% (cinco aislamientos) de una población de 190 aislamientos clínicos identificados anteriormente como *K. pneumoniae* (aisladas desde 1990 hasta 2009). Estos aislamientos representaban clonalmente a otros 499 aislamientos debido a que pertenecían a clonas relacionadas y estaban implicados en brotes intrahospitalarios.

Los cinco aislamientos clínicos identificados como *K. variicola* pertenecen a estados geográficamente distantes (Tabasco, Morelos y Nuevo León) y fueron aislados en años no consecutivos (1996, 1999 y 2007), por lo que la diseminación de *K. variicola* en comparación de *K. pneumoniae* no es constante.

El análisis e identificación de las especies por medio de las sondas moleculares fue comprobada por el análisis filogenético de los genes housekeeping *rpoB* y *gyrA*, por lo que la sensibilidad y especificidad de las sondas moleculares fue del 100% y las condiciones de reacción pueden ser implementadas en los laboratorios microbiológicos para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae*.

Perspectivas

- Determinar la prevalencia de *K. variicola* y *K. pneumoniae* en cepas clínicas identificadas anteriormente como *K. pneumoniae* aisladas en hospitales sin incluir como criterio de inclusión el conocer la susceptibilidad antimicrobiana.
- Determinar mediante el análisis de los genomas de *K. variicola* y *K. pneumoniae* si existe alguna diferencia metabólica y proponerla como posible prueba para la identificación de *K. variicola* y *K. pneumoniae* e implementarla en pruebas bioquímicas para su utilización en laboratorios microbiológicos.
- Comparar diferentes genomas de cepas de *K. variicola* aisladas de otros ambientes.
- Analizar la virulencia y patogenicidad de *K. variicola*.

Referencias

Alcantar- Curiel, D., Tinoco, J.C., Gayosso, C., Carlos, A., Daza, C., Pérez- Prado, M.C., Salcido, L., Santos, J.I., Alpuche- Aranda, C. 2004. Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended- spectrum β- lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. Clinical Infectious Diseases. 38: 1067- 1074.

Alves, M. S., da Silva- Días, R. C., Días- de Castro, A. C., Riley, L. W., Moreira, B. M. 2006. Identification of clinical isolates of índole- positive and índole- negative *Klebsiella* spp. Journal of Clinical Microbiology. 44:3640- 3646.

Andrade, V., Grupo de Resistencia Bacteriana, Silva, J. 2004. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la β– lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. Salud Pública de México. 46: 524- 528.

Babini, G.S., Livermore, D.M. 2000. Are SHV β- lactamase universal in *Klebsiella pneumoniae*?. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44 (8): 2230.

Biedenbach, D.J., Moet, G.J., Jones, R.N. 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997- 2002). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 50 (1): 59- 69.

Bradford, P.A. 2001. Extended- spectrum β- lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Reviews. 14 (4): 933- 951.

Brisse, S., Verhoef, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51:915-924.

Brisse, S., van Himbergen, T., Kusters, K., Verhoef, J. 2004. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. Clinical Microbiology and Infection. 10 (10): 942- 945.

Brisse, S., Grimont, F., Grimont, P.A.D. 2006. The genus *Klebsiella*. The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd ed. New York: Springer.

Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski, P.G. 2010. The evolution and future of earth´s nitrogen cycle. Science. 330: 192- 196.

Chaves, J., Ladona, M.G., Segura, C., Coira, A., Reig, R., Ampurdanés, C. 2001. SHV-1 β-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (10): 2856- 2861.

Chelius, M. K. and E. W. Triplett. 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. Applied and Environmental Microbiology. 66:783-787.

Cocking, E.C. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen- fixing bacteria. Plant and Soil. 252: 169- 175.

Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R. 2008. Increasing prevalence of ESBL. Producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Eurosurveillance. 13 (47): 1- 11.

Datta, N., Kontmichalou, P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 208: 239- 244.

De la Maza, L. M., Pezzlo, M. T., Shigei, J. T., Peterson, E. M. 2004. Color atlas of medical bacteriology. ASM Press.

Dixon, R., Kahn, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nature. 2: 621-631.

Dong, Y., Glasner, J.D., Blattner, F.R., Triplett, E.W. 2001. Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 open reading frames. Applied and Environmental Microbiology. 67(4): 1911- 1921.

Doolittle, M., Raina, A., Lax, A., Boopathy, R. 2008. Presence of nitrogen fixing *Klebsiella pneumoniae* in the gut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). Bioresource Technology. 99. 3297-3300.

Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier, P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov., and *Raoultella planticola* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 925-932.

Drawz, S.M., Bonomo, R.A. 2010. Three decades of β- lactamase inhibitors. Clinical Microbiology Reviews. 23(1): 160- 201.

Espinal, P., Garza- Ramos, U., Reyna, F., Rojas-Moreno, T., Sánchez- Pérez, A., Carrillo, B., Martínez, P., Mattar, S., Silva- Sánchez, J. 2010. Identification of SHV- type and CTX-M-12 extended- spectrum β- lactamase (ESBLs) in multiresistant *Enterobacteriaceae* from colombian caribbean hospitals. Journal of Chemotherapy. 22 (3): 160- 164.

Espinosa de los Monteros, L., Silva- Sánchez, J., Jiménez, L., Rojas, T., Garza- Ramos, U., Valverde, V. 2008. Outbreak of infection by extended- spectrum β- lactamase SHV-5- producing *Serratia marcescens* in a Mexican Hospital. Journal of Chemotherapy. 20: 586- 592.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenza* Rd. Science. 269 (5223): 496- 512.

Fouts, D. E., Tyler, H. L., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J. H., Durkin, A. S., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R. J., Mohamoud, Y., Khouri, H., Roesch, L. F. W., Krogfelt, K. A., Struve, C., Triplett, E. W., Methé, B. A. 2008. Complete Genome Sequence of the N2- Fixing Broad Host Range Endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and Virulence Predictions Verified in Mice. Plos Genetics. 4:1- 18.

Garza-González, E., Mendoza- Ibarra, S.I., Llaca- Díaz, J.M., González, G.M. 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended- spectrum β-lactamase- producing *Enterobaceriaceae* isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. Journal of Medical Microbiology. 60: 84-90.

Garza- Ramos, U., Martínez- Romero, E., Silva- Sánchez, J. 2007. SHV- type extended-spectrum β- lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. Salud Pública de México. 49: 415-421.

González- Vertiz, A., Alcantar- Curiel, D., Cuauhtli, M., Daza, C., Gayosso, C., Solache, G., Horta, C., Mejía, F., Santos, J.I., Alpuche- Aranda, C. 2001. Multiresistant extended- spectrum β-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* causing an

outbreak of nosocomial bloodstream infection. Infection Control and Hospital Epidemiology. 22: 723- 725.

Grimont, F., Grimont, P. A. D., Richard, C. The genus *Klebsiella*. In: The Prokaryotes. (Dworkin et al. eds.) 2nd ed., New York, Springer Verlag, 2000.

Hallmann, J., Quadt- Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology. 43 (10): 895-914.

Highsmith, A. K., Jarvis, W. R. 1985. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. Infection Control: IC. 6:75-77.

Haeggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J. Brisse, S. 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal β- lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48(7): 2400- 2408.

Iniguez, A. L., Dong, Y., Triplett, E.W. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. American Phytopathological Society. 7:1078-1085.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409: 860-921.

James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Research. 65:197-209.

Kneip, C., Lockhart, P., Vob, C., Maier, U. 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes- New models for symbiosis. BMC Evolutionary Biology. 7(55).

Kovtunovych, G., Lar, O.,Kamalova, S., Kordyum, V., Kleiner, D., Kozyrovska, N. 1999. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissues. Plant and soil. 215:1-6.

Lai, Y.C., Yang, S.L., Peng, H.L., Chang, H.Y. 2000. Identification of genes present specifically in a virulent strain of *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity. 68(12): 7149- 7151.

Livermore, D.M. 1995. β- lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews. 8(4): 557-584.

Malkawi, H.I., Gharaibeh, R. 2004. Rapid and simultaneous identification of two *Salmonella enterica* serotypes, *enteritidis* and *typhimurium* from chicken and meat products by multiplex PCR. Biotechnology. 3(1): 44- 48.

Mano, H., Morisaki, H. 2008. Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes and Environment. 23(2): 109- 117.

Martínez- Aguilar, G., Alpuche- Aranda, C., Anaya, C., Alcantar- Curiel, D., Gayosso, C., Daza, C., Mijares, C., Tinoco, J.C., Santos, J.I. 2001. Outbreak of nosocomial sepsis and pneumonia in a newborn intensive care unit by multiresistant extended- spectrum β-lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae*: high impact on mortality. Infection Control and Hospital Epidemiology. 22: 725- 728.

Martinez, J., Martinez, L., Rosenblueth, M., Silva-Sanchez, J., Martinez- Romero, E. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. International Microbiology. 7:261-268.

Masepohl, B., Kranz, R.G. 2008. Regulation of nitrogen fixation. En The purple phototrophic bacteria, advances in photosynthesis and respiration. Springer.

Miranda, G., Castro, N., Leaños, B., Valenzuela, A., Garza- Ramos, U., Rojas, T., Solórzano, F., Chihu, L., Silva, J. 2004. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended- spectrum β- lactamase in a mexican pediatric hospital. Journal of Clinical Microbiology. 42 (1): 30- 35.

Mohanta, S., Sharma, G.D., Deb, B. 2010. Diversity of endophytic diazotrophs in non-leguminous crops ï A review. Assam University Journal of Sciences and Technology. 6(1): 109- 122.

Mollet, C., Drancourt, M., Didier, R. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Molecular Microbiology. 26: 1005- 1011.

Mosqueda- Gómez, J.L., Montaño- Loza, A., Rolón, A.L., Cervantes, C., Bobadilla- del-Valle, J.M., Silva- Sánchez, J., Garza- Ramos, U., Villasís- Keever, A., Galindo-

Fraga, A., Ruiz- Palacios, G.M,. Ponce- de- León, A., Sifuentes- Osornio, J. 2008. Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended- spectrum β- lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* a case-control study. International Journal of Infectious Diseases. 12: 653- 659.

Organización Mundial de la Salud. 2002. Infecciones Nosocomiales. Guía Práctica. 2a Edición.

Pinto- Tomás, A.A., Anderson, M.A., Suen, G., Stevenson, D.M., Chu, F.S.T., Wallace-Cleland, W., Weimer, P.J., Currie, C.R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf- cutter ants. Science. 326: 1120- 1123.

Podschun, R., Ullmann, U.1998. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews. 11: 589- 603.

Podschun, R., Pietsch, S., Holler, C., Ullmann, U. 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. Applied and Environmental Microbiology. 67:3325- 3327.

Primrase, S.B., Twyman, R.M. 2003. Principles of genome analysis and genomes. 3rd edition. Blackwell publishing.

Prodinger, W.M., Fille, M., Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Amann, S., Pfausler, B., Lass-Flor, L.C., Dierich, M.P. 1996. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β- lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. Journal of Clinical Microbiology. 34(3): 564- 568.

Reyes- Prieto, B.M. 2010. Secuenciación, ensamble y análisis comparativo del genoma de *Klebsiella variicola* 801. Tesis de Licenciatura. Centro de Ciencias Genómicas.

Rosenblueth, M., Martinez, L., Silva- Sanchez, J., Martinez- Romero, E. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant- associated isolates. Systematic and Applied Microbiology.27: 27-35.

Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A. Klemm, P. 2005. Capsule and Fimbria in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity. 73:4626- 4633.

Silva, J., Aguilar, C., Becerra, Z., López- Antuñano, F., García, R. 1999. Extended-spectrum β- lactamases in clinical isolates of Enterobacteria in Mexico. Microbial Drug Resistance. 5(3): 189- 193.

Silva, J. Gatica, R., Aguilar, C., Becerra, Z., Garza- Ramos, U., Velázquez, M., Miranda, G., Leaños, B., Solórzano, F., Echániz, G. 2001. Outbreak of infection with extended- spectrum β- lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* in a mexican hospital. Journal of Clinical Microbiology. 39 (9): 3193- 3196.

Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P. 1999a. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. Letters in Applied Microbiology. 28(2): 113-117.

Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G., Colin, P. 1999b. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swaps of poultry houses. Letters in Applied Microbiology. 29(1): 1-6.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló- Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 1043- 1047.

Tripathi, AK., Chowdhury, S.P., Parashar, V. 2007. Biological nitrogen fixation: from fundamentals to field considerations. En Agricultural Nitrogen Use and Its Environmental Implications. I. K. International Pvt Ltd.

Triplett, E. W. 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. Plant and Soil. 186:29-38.

Van- Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, E.J. 2010. High- throughput identification of bacteria and yeast by matrix- assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. Journal of Clinical Microbiology. 48(3): 900- 907.

Venter, J.C. et al. 2001. The sequence of the human genome. Science. 291: 1304-1351.

Westbrook, G. L., O´Hara, C. M., Roman, S. B., Miller, J. M. 2000. Incidence and identification of *Klebsiella planticola* in clinical isolates with emphasis on newborns. Journal of Clinical Microbiology. 38:1495- 1497.

Williams, P., Tomas, J. M. 1990. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. Reviews of Medical Microbiology. 1:196- 204.

Wu, K. M., Li, L. H.,Yan, J. J., Tsao, N., Liao, T. L., Tsai, H. C., Fung C. P., Chen, H. J., Liu, Y. M., Wang, J. T., Fang, C. T., Chang, S. C., Shu, H. Y., Liu, T. T., Chen, Y. T., Shiau, Y. R., Lauderdale, T. L., Su, I. J., Kirby, R., Tsai, S. F. 2009. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH- K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. Journal of Bacteriology. 191:4492-4501.