



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Evaluación de la patogenicidad de la cepa
Klebsiella variicola TpF2R9 en modelo murino**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A:

JESSICA JANET RAMOS SANTIN

DIRECTOR

Dr. JESUS ULISES GARZA RAMOS MARTINEZ

CUERNAVACA, MORELOS

Marzo, 2024

INDICE

1	Introducción.....	4
1.1	Género <i>Klebsiella</i>	4
1.2	Fenotipos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
1.3	Características de <i>K. pneumoniae</i> clásica e hipervirulenta.....	6
1.4	Cápsula e hipercápsula.....	7
1.5	Sideróforos.....	8
1.5.1	Aerobactina.....	9
1.5.2	Enterobactina.....	10
1.5.3	Yersiniabactina	10
1.5.4	Salmochelina.....	11
1.6	Características genéticas de <i>K. pneumoniae</i> hipervirulenta	12
1.7	<i>Klebsiella variicola</i>	13
1.8	<i>Klebsiella variicola</i> hipervirulenta.....	15
2.	Antecedentes.....	16
3.	Justificación.....	18
4.	Hipótesis.....	19
5.	Objetivos	19
5.1	Objetivo general.....	19
5.2	Objetivos específicos	19
6.	Metodología	20
6.1	Estrategia experimental.....	20
6.2	Aislamientos bacterianos.....	20
6.3	Extracción de DNA por choque térmico.....	20
6.4	PCR multiplex para identificación de especies.....	21
6.5	Identificación de los factores de virulencia mediante PCR.....	22
6.6	Electroforesis de los productos de PCR.....	22
6.7	Extracción y análisis de plásmidos.....	22
6.8	Bacterias electrocompetentes.....	23
6.9	Transformación de células competentes por electroporación	24
6.10	Curva de crecimiento.....	24
6.11	Determinación del nivel de virulencia en un modelo murino.....	25
6.12	Necropsia y obtención de tejidos	26
6.13	Resistencia a suero humano.....	26
6.14	Resistencia a la fagocitosis por neutrófilos.....	27
7.	Resultados.....	31
7.1	PCR factores de virulencia e hipermucoviscosidad	31
7.2	Ensayos <i>in vitro</i>	32
7.2.1	Resistencia suero humano no inmune.....	32
7.2.2	Resistencia a fagocitosis por neutrófilos	32
7.3	Ensayo <i>in vivo</i>	34
7.3.1	Determinación de nivel de patogenicidad en modelo murino.....	34
7.4	Necropsia y obtención de tejidos.....	35
7.5	Comprobación de especie y factores de virulencia mediante PCR.....	41
7.5.1	PCR MULTIPLEX.....	41

7.5.2 PCR para factores de virulencia <i>rmpA</i> – <i>iucA</i>	41
7.5.3 ERIC-PCR.....	42
8. Discusión.....	43
9. Conclusión.....	48
10. Perspectiva	49
Referencias.....	50

INTRODUCCION

1.1 Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* fue descrito por Trevisan en 1885 y fue nombrado en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs; así mismo, en 1887 descubrió la especie de *Klebsiella pneumoniae*. El género *Klebsiella* se encuentra distribuido en la naturaleza: como en el agua, suelo, plantas y en desagües de aguas negras. Se considera que la colonización en los humanos proviene de algunas de estas diversas fuentes (Matsen, 1974).

Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos Gram-negativos inmóviles que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella variicola subsp. tropica*, *Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae* y *Klebsiella quasipneumoniae subsp. Similipneumoniae*, *Klebsiella quasivariicola* y *Klebsiella africana*. La capa más externa de *Klebsiella spp.* está formada por una gran cápsula de polisacáridos que diferencia a estos microorganismos de otros géneros de esta familia.

Las cepas del este género se han descrito con mayor frecuencia asociadas a septicemias, neumonías y en infecciones urinarias intrahospitalarias. Colonizan las mucosas de los mamíferos y en los humanos se encuentran en los epitelios de la nariz, faringe y en el tracto intestinal (brisse y Verhoef, 2001). Igualmente, se les ha asociado con mastitis en bovinos, con rinitis crónica atrófica, diarreas hemorrágicas y con infecciones fatales (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

1.2 Fenotipos de *Klebsiella pneumoniae*

La clasificación de *K. pneumoniae* se encuentra dividida en dos fenotipos las denominadas clásicas e hipervirulentas (hv). Sus diferencias radican principalmente de acuerdo con sus características fenotípicas y genotípicas que incluyen resistencia a antibióticos, el un numero de factores de virulencia y la producción de

hipermucoviscosidad. El fenotipo de *K. pneumoniae* clásico presenta multirresistencia a antibióticos entre ellos la familia de los β -lactámicos, no produce hipermucoviscosidad y presenta un menor número de factores de virulencia. Por otra parte, el fenotipo de *K. pneumoniae* hipervirulenta (Kpn-hv) presenta el fenotipo hipermucoviscoso (hmv), es sensible a la mayoría de los antibióticos, y contiene un mayor número de factores de virulencia. Estas características influyen directamente en su tipo de infección y en el rango de personas susceptibles a adquirirla. Las principales diferencias entre los fenotipos de *K. pneumoniae* se observan en la Tabla 1 (Paczosa y Mecsas, 2016).

Tabla 1. Características de las cepas clásicas e hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* (Paczosa y Mecsas, 2016).

Parámetro	Característica (s) para el tipo de cepa	
	Clásico	Hipervirulenta
Tipos más comunes de infección	Neumonía, infección urinaria, bacteremia	Absceso hepático piógeno; bacteriemia; pulmón, cuello y abscesos renales; neumonía; celulitis; La fascitis necrotizante; miositis, meningitis; endoftalmitis
Población susceptible (s)	Inmunodeprimidos (diabéticos, pacientes con tumores malignos)	Diabéticos, personas sanas.
Tipo (s) de la cápsula	Cápsula serotipos K1-K78	Hipercápsula serotipo K1 (93%) o K2
Sideróforos (% de las cepas expresando sideróforo)	Enterobactina (100), yersiniabactina (17-46), salmochelina (2-4), aerobactina (6)	Enterobactina (100), yersiniabactina (90), salmochelina (>90), aerobactina (93-100)
La concentración geográfica	En todo el mundo	Principalmente Taiwán y el sudeste de Asia
Infección adquirida principalmente por tipo	nosocomial	adquirida en la comunidad
Frecuencia de los informes de Resistencia antibiótica	Frecuente (BLEE y productor de carbapenemasas)	Infrecuente

Las cepas de producen una hipercápsula, que amplifica la producción de material capsular, dando como resultado una cápsula relativamente más grande, y son predominantemente del serotipo K1, mientras que las cepas restantes son del serotipo K2. El LPS, una parte integral de la membrana externa es producido por las cepas clásicas y de *K. pneumoniae hv*. Ambos tipos de *K. pneumoniae* crean estructuras adhesivas unidas a la membrana, fimbrias de tipo 1 y tipo 3, y segregan sideróforos captadores de hierro. De los sideróforos, la enterobactina se produce en casi todas las

cepas, y la yersiniabactina se produce en aproximadamente la mitad de las cepas clásicas y casi todas las cepas hv. Salmochelina y aerobactina rara vez son producidas por cepas clásicas, pero típicamente son secretadas por cepas hv, siendo la aerobactina el más altamente expresado de los sideróforos.

Hay cuatro factores de virulencia bien caracterizados para *K. pneumoniae* patógenos: cápsula, LPS, fimbrias (tipo 1 y tipo 3) y sideróforos. La cápsula es una matriz extracelular de polisacáridos que envuelve a las bacterias. Las cepas clásicas de *K. pneumoniae* producen una cápsula que puede ser de cualquiera de los serotipos K1 a K78; K1 y K2 están asociados con una mayor patogenicidad (Paczosa y Mecsas, 2016).

1.3 Características de *K. pneumoniae* clásica e hipervirulenta

K. pneumoniae emplea muchas estrategias para crecer y protegerse de la respuesta inmune del huésped. Hasta la fecha, hay cuatro clases principales de factores de virulencia que han sido bien caracterizados en *K. pneumoniae*. Estos factores de virulencia consisten en: i) cápsula e hipercápsula, ii) sideróforos, iii) lipopolisacáridos (LPS) y iv) fimbrias, también conocido como pili (Figura 1) (Paczosa y Mecsas, 2016).

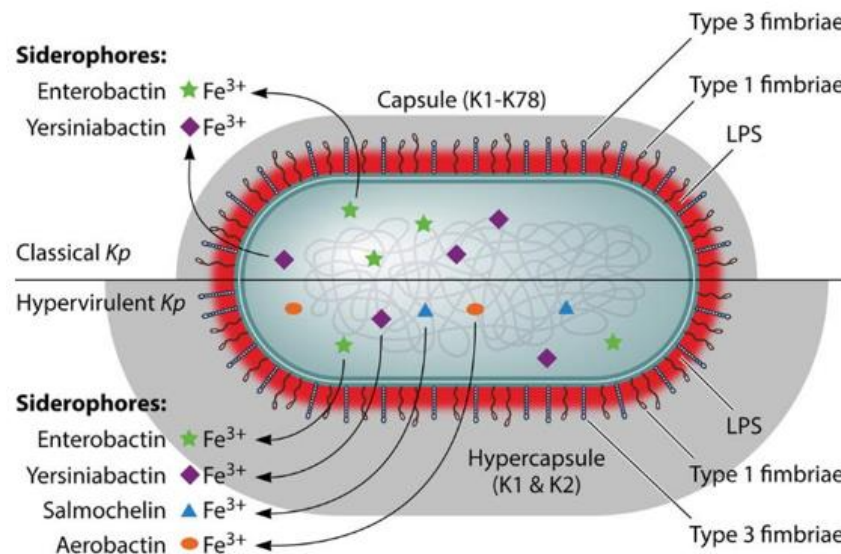


Figura. 1 Cápsula y factores de virulencia. Se muestran cuatro factores de virulencia bien caracterizados en cepas de *K. pneumoniae* (Kp) clásicas e hipervirulentas (Paczosa y Mecsas, 2016).

1.4 Cápsula e hipercápsula

La cápsula, una matriz de polisacáridos que cubre la célula, es necesaria para la virulencia de *K. pneumoniae* y es posiblemente el factor de virulencia más estudiado de *K. pneumoniae* (Figura 2). Las cepas de *K. pneumoniae* acapsulares son dramáticamente menos virulentas que las cepas encapsuladas isogénicas en modelos de ratón, basado en el decremento de bacterias en los pulmones, menores tasas de mortalidad del ratón y una incapacidad de las bacterias para diseminarse sistémicamente.

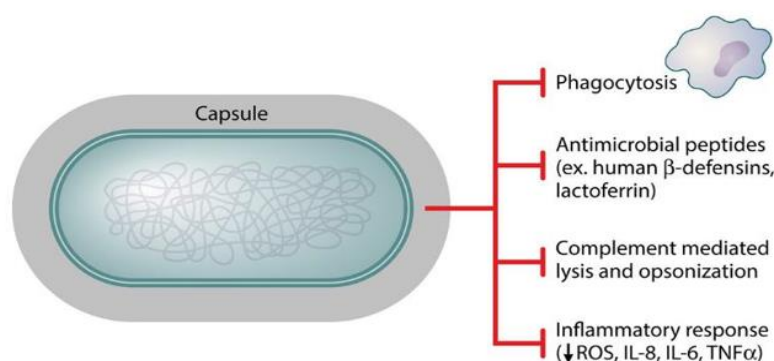


Figura 2. Papel de la cápsula en virulencia de *K. pneumoniae* (Paczosa y Meccas, 2016).

Un número de diferentes funciones para la cápsula se han delineado para *K. pneumoniae* virulencia. En primer lugar, cápsula impide la fagocitosis y la opsonofagocitosis de las bacterias por las células inmune. En segundo lugar, que dificulta la acción bactericida de péptidos antimicrobianos tales como defensinas beta humano 1 a 3 y lactoferrina por unión a estas moléculas distales de la membrana externa. En tercer lugar, bloques de componentes del complemento, tales como C3, de la interacción con la membrana, evitando así la lisis y la opsonización mediada por el complemento. Por último, se evita la activación fulminante de la respuesta inmune, tal como se mide por la disminución de especies reactivas del oxígeno (ROS), IL-8, IL-6.

Por otra parte las cepas de *K. pneumoniae* con hipercápsula o con fenotipo hiper mucoviscoso que consiste en un recubrimiento bacteriano de exopolisacárido mucoviscoso que es más robusto que el de la cápsula típica (Figura 1). Esta

hipercápsula puede contribuir significativamente a la patogenicidad de *K. pneumoniae* hv. Tanto la cápsula clásica como la hipercápsula de hv están constituidas por polisacáridos capsulares específicos de la cepa denominados antígenos K (denominados, K1 y K2, hasta K78). Los genes necesarios para la producción de cápsulas tanto en las cepas clásicas como en las de *K. pneumoniae* hv se localizan en un operón cromosómico.

El fenotipo de *K. pneumoniae* hipervirulenta con fenotipo hipermucoviscoso fue identificado en Taiwán, observándose la característica de hmv en cepas que causan infecciones invasivas. Los genes responsables son denominados “genes reguladores del fenotipo mucoide”, *rmpA* y *rmpA2*, los cuales se presenta tanto a nivel cromosomal y/o plasmídico. Estos activadores transcripcionales activan la biosíntesis de la capsula, sobre-expresando el clúster *cps* al unirse al promotor. La característica de la hmv es proporcionar una mayor resistencia a la fagocitosis y a la opsonización por macrófagos, neutrófilos, células epiteliales por el bloqueo de unión. Para identificar cepas de *K. pneumoniae* hv se ha propuesto la prueba de “string test”, donde se puede observar mediante una haza un hilo que se forma (Figura 3) (Shon, Bajwa, y Russo, 2013).



Figura 3. Fenotipo hipermucoviscoso. Colonias de *K. pneumoniae* hipermucoviscosa en donde se observa el filamento característico de la hipermucoviscosidad. (Shon, Bajwa, y Russo, 2013).

1.5 Sideróforos

El hierro es necesario por *K. pneumoniae* para prosperar durante la infección, este metal no está disponible en el huésped durante la misma, principalmente debido a que,

como parte de la respuesta inmune no específica, el huésped lo secuestra para restringir el crecimiento de posibles patógenos. Normalmente, hay poco hierro libre en el plasma del hospedero ya que está vinculado a moléculas de transporte de hierro tales como la transferrina. Huéspedes mamíferos pueden reducir aún más los niveles de hierro tras la infección bacteriana por la unión de hierro a lactoferrina, que es una proteína de defensa innata presente en los fluidos corporales. Por lo tanto, *K. pneumoniae*, como muchos otros patógenos bacterianos, debe emplear tácticas para adquirir hierro desde con el fin de sobrevivir y propagarse durante la infección del mamífero.

La táctica predominante utilizada por muchos patógenos, incluyendo *K. pneumoniae*, para adquirir hierro es a través de la secreción de proteínas denominadas “sideróforos”, las cuales, son moléculas que poseen una mayor afinidad por el hierro que proteínas de transporte del huésped. Los sideróforos pueden robar hierro a partir de proteínas quelantes del hierro del huésped o buscarlo desde el medio ambiente. Cepas de *K. pneumoniae* codifican varios sideróforos, y la expresión y la contribución de cada sideróforo a la virulencia es variable. La producción de más de un sideróforo por *K. pneumoniae* puede ser una manera de optimizar la colonización exitosa de diferentes tejidos y/o evitar la neutralización de uno sideróforo por el huésped. Los sideróforos que se expresan *K. pneumoniae* son: aerobactina (*iucA*), enterobactina (*entB*), yersiniabactina (*ybtS*) y salmochelina (*iroA*). La afinidad de estos sideróforos para el hierro varía de aerobactina con el más alto a enterobactina con el más bajo (Paczosa y Meccas, 2016).

1.5.1 Aerobactina (*iucA*)

Aerobactina es un sideróforo de tipo hidroxamato. Rara vez se expresa en aislados clásicos de *K. pneumoniae*, se encuentra en sólo el 6% de las cepas clásicas, sin embargo, está presente en el 93 al 100% de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas. La presencia de aerobactina siempre se asocia con una hipercapsula, aunque no todas las cepas con hipercápsula poseen este sideróforo (Paczosa y Meccas, 2016).

1.5.2 Enterobactina (*entB*)

La expresión de enterobactina es casi omnipresente entre ambas cepas clásicas y *K. pneumoniae* hv, por lo tanto, se considera que es el sistema primario de captación de hierro utilizado por *K. pneumoniae*. En *K. pneumoniae*, los genes que son necesarios para la biosíntesis enterobactina se localizan en el cromosoma y está conformado por los genes *entABCDEF*, mientras que el grupo de genes *fepABCDG* codifica las proteínas que median en su transporte. Es importante destacar que, mientras que la expresión *fepA* ha demostrado ser aumentada durante la infección *K. pneumoniae*, lo que sugiere una regulación de la funcionalidad enterobactina, así mismo, enterobactina se neutraliza por la molécula lipocalina-2 secretada por el huésped. Lipocalina-2 es una proteína multifuncional que tiene varias capacidades antimicrobianas y durante la infección se libera en muchos tipos de células, incluyendo neutrófilos. Se expresa basalmente, pero la transcripción de este factor es aumentada por el huésped en respuesta a la infección por *K. pneumoniae* en el tracto respiratorio. Lipocalina-2 no mata a *K. pneumoniae* sino más bien inhibe su crecimiento mediante la eliminación de la capacidad de *K. pneumoniae* para secuestrar hierro desde el huésped uniéndose y neutralizando algunos de sus sideróforos secretados por la bacteria. La lipocalina-2 también tiene funciones proinflamatorias: un aumento en su producción por el huésped conduce a un aumento significativo en el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la infección bacteria. La enterobactina, en ausencia de lipocalina-2, ayuda tanto a la colonización como a la diseminación desde los pulmones. Sin embargo, en presencia de lipocalina-2, las cepas de *K. pneumoniae* que producen solo este sideróforo se eliminan (Paczosa y Mecsas, 2016).

1.5.3 Yersiniabactina (*ybtS*)

Yersiniabactina fue descubierta originalmente en el patógeno bacteriano Gram negativo *Yersinia*, pero este sideróforo desde entonces se ha identificado en otras bacterias, incluyendo *K. pneumoniae*. Yersiniabactina se ha observado en sólo el 18% de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* clásica, pero en el 90% de *K. pneumoniae* Hv.

Notablemente, yersiniabactina se expresa durante la infección de pulmón, y su actividad no es inhibida por la lipocalina-2 *in vivo* durante la infección de este órgano, probablemente porque su estructura difiere significativamente de la de enterobactina. Esto permite a *K. pneumoniae* crecer a altas cargas bacterianas en los pulmones durante la infección. Mientras yersiniabactina parece ser impermeable a la lipocalina-2, es incapaz de adquirir el hierro necesario para el crecimiento de *K. pneumoniae* en presencia de la proteína transferrina. Por lo tanto, las cepas que expresan sólo el sideróforo yersiniabactina no son capaces de diseminarse de los pulmones, probablemente debido a la transferrina, que se concentra en el plasma sanguíneo, previene el crecimiento de *K. pneumoniae* en sangre. Por lo tanto, los individuos inmunocompetentes probable pueden resistir la infección por cepas de *K. pneumoniae* que producen solamente yersiniabactina (Paczosa y Mecsas, 2016).

1.5.4 Salmochelina (*iroA*)

Salmochelina es una forma c-glucosilada de enterobactina. Esta modificación se lleva a cabo mediante genes que se encuentran en el cromosoma o en un plásmido dentro del clúster del gen *iroA*, *iroBCDE*. El transporte de hierro está mediado por *IroN*. Es importante destacar que esta modificación evita la unión de salmochelina por lipocalina-2, lo que impide la neutralización de los sideróforos y la inducción de la inflamación dependiente de lipocalina-2. Por lo tanto, no es sorprendente que salmochelina mejore la colonización por *K. pneumoniae* de la nasofaringe en un huésped con suficiente cantidad de lipocalina-2. Debido a que la expresión de salmochelina permite la colonización nasofaríngea por *K. pneumoniae* en hospedadores capaces de producir lipocalina-2, se puede predecir que las poblaciones de pacientes infectadas con cepas positivas a salmochelina pueden estar menos inmunocomprometidas y que las cepas productoras de salmochelina son más virulentas. La salmochelina está presente en solo alrededor del 2 al 4% de las cepas de *K. pneumoniae* nosocomiales, un estudio reveló su presencia en el 90% de cepas de *K. pneumoniae* asociadas con absceso hepático piógeno.

Otros factores han sido identificados recientemente como factores de virulencia importantes para *K. pneumoniae*. Sin embargo, estos factores no se caracterizan a fondo, debido a que no son conocidos profundamente sus mecanismos de acción. Estos factores de virulencia incluyen proteínas de membrana externa (OMP), porinas, bombas de eflujo, sistemas de transporte de hierro y genes implicados en el metabolismo de la alantoína (Paczosa y Meccas, 2016).

1.6 Características genéticas de *K. pneumoniae* hipervirulenta

Un hallazgo interesante en las cepas de *K. pneumoniae* hv K2, es la presencia de un plásmido de virulencia denominado *pLVPK* (Figura 4). El plásmido *pLVPK* consta de 219,385 pares de bases que forma un plásmido circular. Este plásmido de virulencia contiene los *rmpA* y *rmpA2*, genes que codifican proteínas reguladoras para la síntesis de grandes cantidades de polisacáridos capsulares (CPS) el cual ha sido conocido por ser un factor importante asociado a hipervirulencia en *K. pneumoniae* que protege a la bacteria de la actividad bactericida del sistema de complemento y macrófagos en suero. La capacidad de adquisición de hierro es generalmente un requisito previo para un patógeno para establecer la infección al entrar en los hospederos. En *pLVPK* tiene sistemas de adquisición hierro mediada por sideróforos. El operón *iucABCDiutA*, que fue reportado por primera vez en *pCoIV-K30* en *E. coli*, consta de genes responsables de la síntesis y el transporte de aerobactina. La presencia de los genes de síntesis y utilización aerobactina también se ha informado de *Salmonella* y *Shigella spp.*, Que indica que los genes son libremente transferibles dentro del Enterobacteriales, esta noción también es consistente con el hallazgo de grupos de genes homólogos en secuencias de *E. coli* por lo que se ha propuesto que se puede desempeñar un papel en la transferencia horizontal entre patógenos bacterianos (Chen et al., 2004).

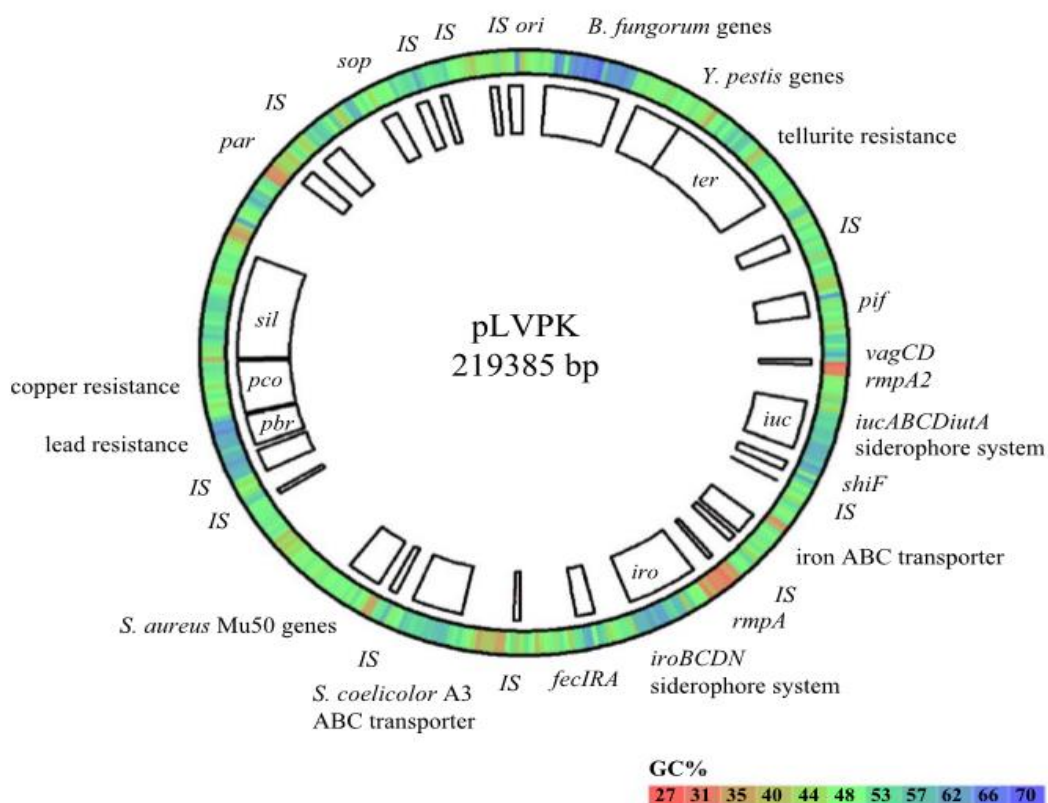


Figura. 4. Mapa del plásmido *pLVPK* consta de 219,385 pares de bases. Este plásmido de virulencia contiene los *rmpA* y *rmpA2*, genes que codifican proteínas reguladoras para la síntesis de grandes cantidades de polisacáridos capsulares, tomado de Chen et al., 2004.

El mapa circular muestra las características principales del plásmido que incluye los orígenes de replicación (*ori*), regiones de partición (*par*, *SOP*), los principales grupos de genes, y elementos (*IS*). Las posiciones de algunos de los *ORFs* y grupos de genes se representan en la caja y sus contenidos fueron marcados. Grupos de genes, que son homólogos, grupos de genes desconocidos, reportados de otras especies, que se etiquetan con el nombre de la especie, respectivamente. El % de contenido G + C a lo largo del plásmido se muestra en colores de bajo % (rojo) a alto % (púrpura).

1.7 *Klebsiella variicola*

Klebsiella variicola fue descrita en el año 2004 mediante un estudio en base a análisis filogenético derivado de las secuencias de los genes *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *infB*, *phoE* y *nifH* y sobre distintos fenotipos. Las bacterias de esta nueva especie están genéticamente

aisladas de cepas de *K. pneumoniae*, no fermentan el adonitol y se obtuvieron de plantas (como el banano, el arroz, la caña de azúcar y el maíz) y hospitales, son abundantes en las plantas y representan menos del 10% de aislados clínicos considerado previamente como *K. pneumoniae* (Rosenblueth, Martínez, Silva, & Martínez-Romero, 2004).

En un estudio reciente donde se evaluó la capacidad de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* de adaptación a entornos clínicos y de plantas se demostró que los genomas de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* compartían un conjunto de genes asociados a la virulencia que codificaban principalmente sideróforos (aerobactina y enterobactina), metabolismo de la urea, enzimas de biosíntesis de lipopolisacáridos y la fimbria que está codifican el operón de genes *mrkABCDFHIJ*. Los sideróforos pueden tener funciones redundantes dado que todos están involucrados en la adquisición de hierro bacteriano. Sin embargo, el número de sideróforos en una sola célula y su tipo puede ser importante para regular el flujo de incorporación de hierro a la célula bacteriana, un proceso que está relacionado con la invasión de los tejidos del huésped y, por lo tanto, la virulencia (Garza-Ramos, 2018).

Las cepas de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* con repertorios genéticos diferentes tienen la capacidad de adaptarse a los entornos clínicos y de plantas. Las plantas pueden ser un reservorio de aislamientos de *K. variicola* que pueden infectar de forma oportunista a humanos o animales. La infección por *K. variicola* en humanos parece ser un caso de "fitonosis", un término que se sugirió para las bacterias simbióticas transmitidas por las plantas, paralelo al término de zoonosis donde bacterias patógenas infectan humanos y son de origen animal (Garza-Ramos, 2018). Se han descrito también fenotipos hipermucoviscosos de *K. variicola* tal es el caso de la cepa 8916 la cual se obtuvo del esputo de un hombre de 76 años en el Hospital Regional Centenario de la Revolución Mexicana en Morelos, México, en 2011. Este aislado fue inicialmente identificado como un aislado de *K. pneumoniae* susceptible (excepto para la ampicilina) y posteriormente se identificó como *K. variicola* fenotipo hipermucoviscoso mediante string test (Garza-Ramos et al., 2015).

1.8 *Klebsiella variicola* hipervirulenta

Actualmente se encuentran descritos casos de *K. variicola* hipervirulenta, la cual fue recientemente detallada mediante un estudio en el cual reportan la existencia de una cepa que adquirió un plásmido con genes de virulencia similar al plásmido *pLVPK* originario de *K. pneumoniae*. El plásmido designado *pVir_030666* consta de 236,355 pares de bases (pb).

La cepa *K. variicola* WCHKV030666 se reporta como resistente a colistina y polimixina B pero era susceptible a amikacina, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol y tigeciclina.

El plásmido *pVir_030666* contiene los genes de virulencia (*rmpA*, *rmpA2*, *fyuA*, *iucABCD*, *iutA*, *iroBCDN*, *irp1*, *irp2* y *ybtAEPQSTUX*), este a diferencia del plásmido *pLVPK* contiene el gen que codifica para yersiniabactina, el cual suele encontrarse en cromosoma de cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (figura 5) (Lu et al., 2018). A pesar de que esta cepa contenía los genes que codifican el fenotipo mucóide ésta no presentaba dicho fenotipo, debido probablemente a un codón de paro que se encontró en la secuencia de el gen *rmpA2*.

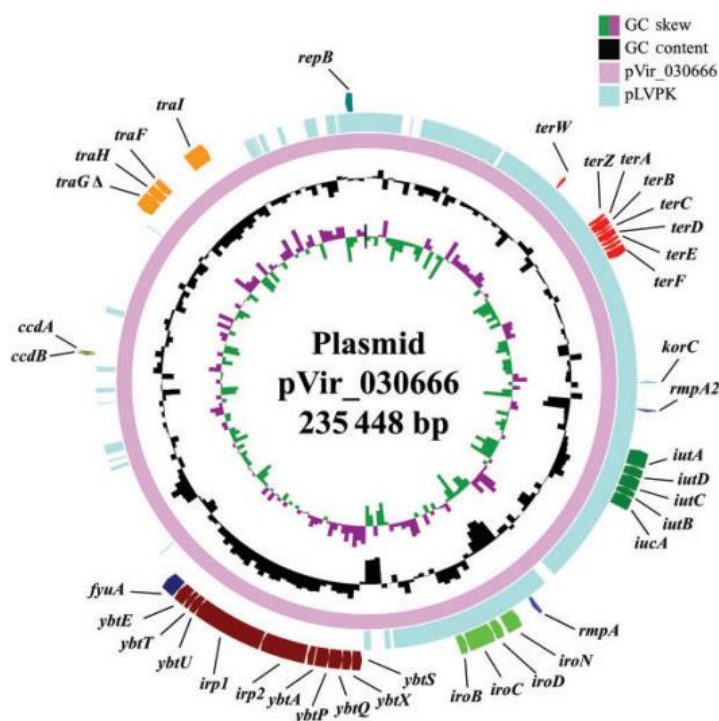


Figura 5 Alineación de plásmido de virulencia *pLVPK* y *pVir_030666*. Se muestran las ubicaciones de genes de virulencia (*rmpA*, *rmpA2*, *fyuA*, *iucABCD*, *iutA*, *iroBCDN*, *irp1*, *irp2* y *ybtAEPQSTUX*). (Lu et al., 2018)

Alrededor del mundo *K. variicola* hipervirulenta comienza a ser de alto interés clínico debido a que se ha asociado con altos índices de mortalidad en sepsis bacteriana, tal es el caso reciente en Bangladesh donde se reporta un brote de sepsis neonatal con un índice de mortalidad del 54,5% en recién nacidos menores a 30 días de edad, se desconocen aún los factores de virulencia que confirieron a la bacteria su alta patogenicidad dado que los sideróforos (yersiniabactina, aerobactina y salmochelina) estaban ausentes en esta cepa. No obstante, se sabe que esta cepa posee un plásmido con *blaNDM-1* y *blaCTX-M-15* que confieren una alta resistencia a antibióticos (Farzana et al., 2019). Esto abre el panorama sobre *K. variicola* que hasta hace poco se pensaba que no tenía factores de virulencia parecidos a *K. pneumoniae*, cabe la posibilidad de que existan en un futuro cercano casos de bacterias multirresistentes e hipervirulentas de *K. variicola*.

2.- Antecedentes

Ante el hecho de que *K. pneumoniae* puede habitar en ambientes hospitalarios en conjunto con otras bacterias se han realizado estudios para evaluar la capacidad que tiene *K. pneumoniae* de adquirir genes de virulencia. En el 2014 investigadores en Estados Unidos evaluaron la capacidad de adquirir genes de virulencia en *K. pneumoniae* productora de KPC (carbapenemasas; una enzima que confiere resistencias a carbapenémicos), a partir de una cepa de *K. pneumoniae* hipervirulenta con serotipo K2 (Siu et al., 2014). Cepas productoras KPC-2 y KPC-3 fueron sometidas a conjugación bacteriana con una cepa de *K. pneumoniae* K2 hipervirulenta. Como resultado de este ensayo, la cepa *K. pneumoniae* K2 adquirió un plásmido que contiene la carbapenemasa KPC-2 y otras resistencias, generando una cepa de *K. pneumoniae* hipervirulenta previamente susceptible en multirresistente. Esto fue derivado de la preocupación que se tiene en ciudades como Nueva York, de las cepas *K. pneumoniae* productora de KPC circulantes en la ciudad al estar en contacto con cepas de *K. pneumoniae* hv de origen asiático, se generen cepas hipervirulentas y multirresistentes, y se ha confirmado que existe esa posibilidad. Esto ocasionaría un reto para el sistema de salud de la región (Siu et al., 2014).

El saber esto despertó el interés de estudiar la capacidad de otras bacterias de adquirir estos genes de virulencia, como fue el caso de un proyecto en el que se hizo un ensayo con *K. pneumoniae* y *K. variicola*, una especie recientemente descrita en el cual se evaluó la patogenicidad de *K. variicola* después de haber sido transformada con el plásmido de virulencia *pLVPK* de *K. pneumoniae*, los resultados de dicho ensayo se muestran a continuación (Figura 6) (Barrera Almanza,2017).

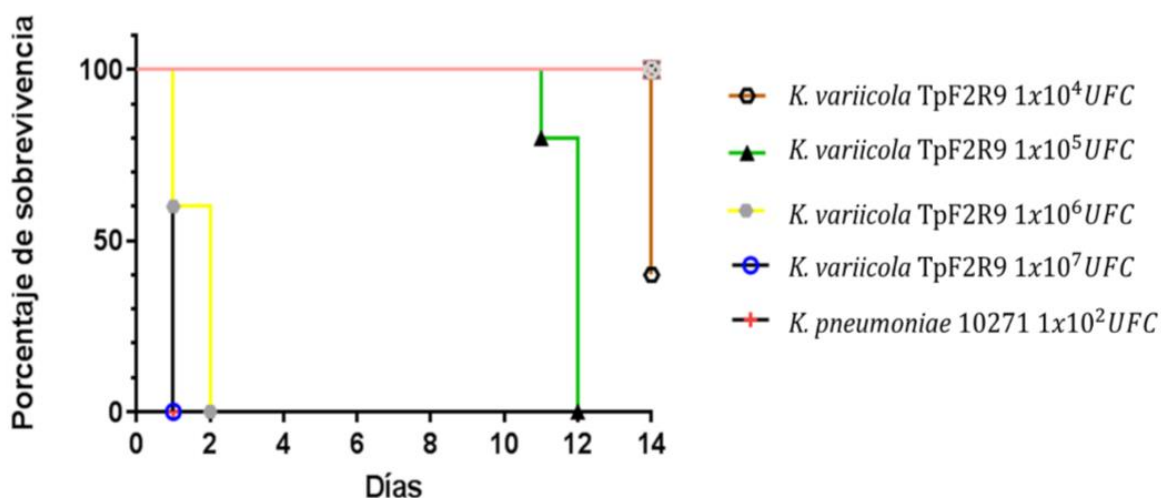


Figura. 6 Supervivencia de ratones al ser inoculados con las diferentes cepas a diferentes dosis.

Para la determinación del nivel de patogenicidad de las cepas *K. variicola* F2R9 y *K. variicola* TpF2R9, se inocularon grupos de cinco ratones para probar distintas concentraciones de UFC tanto de la cepa parental como de la transformante. En la figura 6 se muestra el porcentaje de supervivencia de los tres grupos analizados de bacterias *K. variicola* F2R9, *K. variicola* TpF2R9 y *K. pneumoniae* 10271.

Los estudios de letalidad mediante la inyección vía intraperitoneal muestran que para *K. pneumoniae* 10271 la DL50 es de 10² UFC a las 24h, lo que indica una alta patogenicidad. De las cinco dosis (10³ a 10⁷) que se probaron, en la cepa parental *K. variicola* F2R9 no se observó mortalidad en los ratones. Sin embargo, *K. variicola* TpF2R9 a las dosis 10⁷ y 10⁶ se observó letalidad en los ratones a las 24 y 48h, respectivamente. Para la dosis 10⁵ se observó letalidad entre los días 11 y 12 y por último para la dosis 10⁴ en el día 14.

Aunado a esto, el hecho de la existencia y reciente descripción de cepas multirresistentes e hipervirulentas toma gran relevancia para este estudio pues se busca

determinar cuál es el ciclo de infección y el nivel de patogenicidad que puede tener la cepa TpF2R9 con el plásmido *pLVPK*.

Este plásmido contiene genes que codifican para sideróforos y genes que confieren el fenotipo mucoide tal como la cepa descrita por Yang lu; y colaboradores en 2018, quienes describen una cepa *K. variicola* WCHKV030666 que ha adquirido un plásmido contiene los genes de virulencia (*rmpA*, *rmpA2*, *fyuA*, *iucABCD*, *iutA*, *iroBCDN*, *irp1*, *irp2* y *ybtAEPQSTUX*). Lo cual nos daría una idea del daño que puede causar la infección por *K. variicola* en comparación a *K. pneumoniae*.

3.- Justificación

Dado que *K. variicola* y *K. pneumoniae* habitan en los mismos ambientes e infectan tanto plantas como humanos, surgió la necesidad de explorar la posibilidad de que mediante conjugación pudieran adquirir genes de virulencia o de resistencia al estar en contacto, pudiendo causar problemas de infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en ambientes intrahospitalarios. En el siguiente estudio se pretende evaluar el mecanismo de infección de una cepa transformante de *K. variicola*, la cual a adquirió el plásmido de virulencia *pLVPK* de *K. pneumoniae* mediante electroporación en un estudio anterior (Barrera Almanza, 2017). La cepa *K. variicola* TpF2R9 demostró tener la capacidad de infectar un modelo murino y causar la muerte en el mismo en un mayor rango de tiempo del que lo hace *K. pneumoniae* lo que demuestra que *K. variicola* adquirió patogenicidad como *K. pneumoniae*. Los mecanismos de *K. variicola* para la infección no ha quedado elucidado por lo que la realización de este estudio toma gran relevancia en temas de salud pública.

4.- Hipótesis

La cepa *K. variicola* TpF2R9 al infectar el ratón coloniza primero en el intestino y una vez establecida, logra causar absceso hepático y/o absceso renal provocando la muerte del ratón.

5.- Objetivos

5.1 Objetivo general

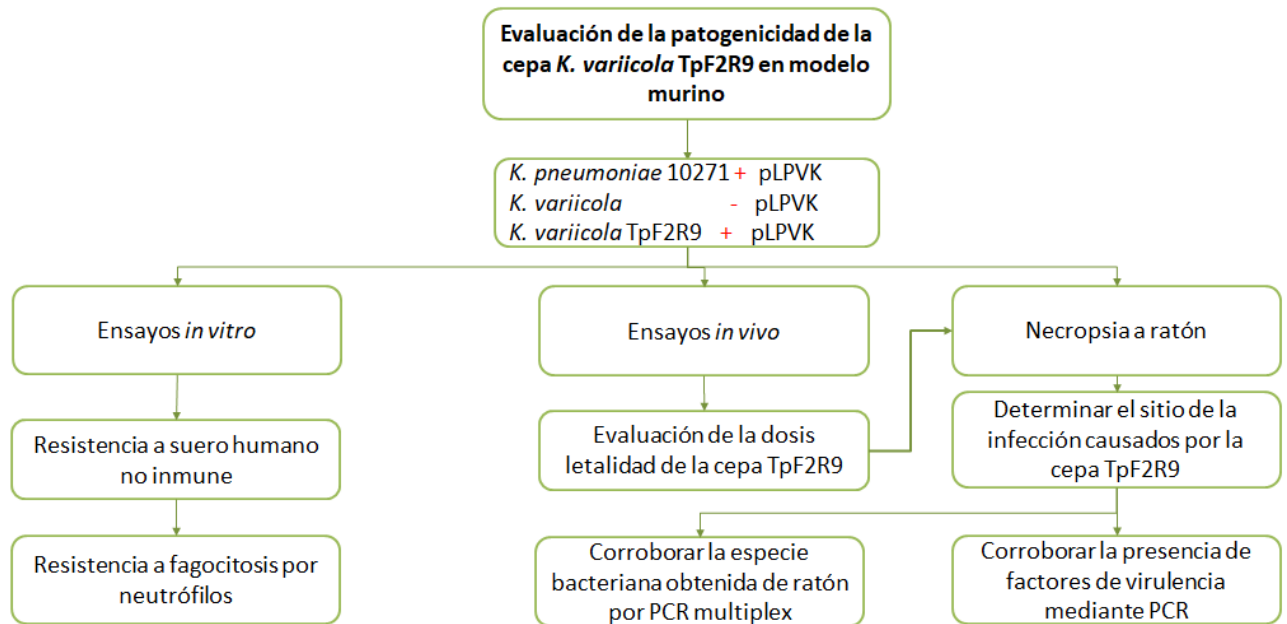
Determinar el mecanismo de infección en *K. variicola* TpF2R9 en modelo murino

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la patogenicidad de *K. variicola* TpF2R9 en modelos *in vitro*.
2. Determinar la patogenicidad de la infección de *K. variicola* TpF2R9 en modelo murino.
3. Reidentificar a *K. variicola* recuperada en ratón y determinar la relación clonal de las cepas.
4. Corroborar la presencia de factores de virulencia en cepa recuperada de infección.

6.- Metodología

6.1 Estrategia experimental



6.2 Aislamientos bacterianos

Al inicio del estudio se contó con un aislamiento previamente caracterizado de *K. pneumoniae* hipervirulenta causante de infecciones en la comunidad. Este aislamiento de *K. pneumoniae* 10271 obtenido de absceso hepático, presenta el fenotipo hipermucoviscoso, y contiene los genes de virulencia *iucA*, *irp2*, *rmpA* y *rmpA2* y es considerada una cepa hipervirulenta.

Además de esta cepa, se contó con la cepa *K. variicola* F2R9 que originalmente fue aislada de raíz de árbol de banana en el estado de Colima, esta fue previamente estudiada en un proyecto de tesis mediante el cual se le fueron transferido el plásmido de virulencia de la cepa *K. pneumoniae* 10271, descrita anteriormente (Barrera Almanza, 2017). Se determinó que el plásmido corresponde al plásmido de virulencia pLVPK. Por lo anterior se obtuvo la cepa transformante de *K. variicola* TpF2R9 con la cual se trabajó el siguiente proyecto.

6.3 Extracción de DNA por choque térmico.

La extracción de DNA total de las cepas de *Klebsiella spp.* se realizó mediante la técnica de choque térmico, donde se tomaron algunas colonias de cada cepa de

Klebsiella del agar de cultivo. Se sometieron a una temperatura de por 96°C durante 10 min, después se pasaron a frío a 4°C durante 5 min, este procedimiento se realizó por triplicado. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante, para colocarlo en otro tubo eppendorf. Finalmente se realizó una dilución 1:10 del DNA extraído y agua estéril, la cual se pudo conservar a -20°C.

6.4 Confirmación del género y especies del género *Klebsiella* mediante PCR multiplex.

Se realizó una PCR multiplex para la confirmación del género y especie de las cepas de *Klebsiella* donde se utilizó una mezcla con un volumen final de 25µL que contenía 2.5 mM de MgCl₂, 2.5 mM de dNTP's, 25 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerasa y 3µL de DNA total. Los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en la Tabla 2. Los ciclos comprendidos constaron de un ciclo de desnaturalización inicial 92°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 92°C por 30s, temperatura de alineamiento a 60°C por 30 s, 72°C por 40 s, una extensión final de 72°C de 3 min, y 4°C para mantener (tabla 2).

Tabla 2 Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Gen	Secuencia	Tamaño aproximado	Especie
Kv275	Diguanilatofosfodiesterasa	Kv275-F GATCGCCCTGATCGGCTGCT Kv275-R CCGACGGAAGTGGTAAACGA	275pb	<i>Klebsiella variicola</i>
Kq372	Tripartite tricarboxilato transportador TctA	Kq372-F GATCGCCCTGATCGGCTGCT Kq372-R CCGAACGCCAGCGACCACTG	372pb	<i>Klebsiella Quiasipneumoniae</i>
Kpn650	Fosfoenolpiruvato mutasa	Kp650-F TGCTTGCCAATGTCTGGGAT Kp650-R TCTGGCCTGCGTCGAGCAT	650pb	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

6.5 Identificación de los factores de virulencia mediante PCR

Una vez que se identificaron correctamente las especies de *K. pneumoniae* y *K. variicola*, se confirmó que las cepas a utilizar para el ensayo contenían los factores de virulencia para lo cual se realizó un PCR.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la identificación de los factores de virulencia de interés son descritos en la Tabla 3.

Tabla 3 Oligonucleótidos de factores de virulencia e hipermucoviscosidad

Gen	Secuencia del oligonucleótido (5´-3´)	Tamaño Aproximado
<i>iucA</i> (aerobactina)	<i>iucA</i> -F AATCAATGGCTATTCCCGCTG <i>iucA</i> -R CGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG	239 pb
<i>irp2</i> (yersiniabactina)	<i>irp2</i> -F GCTACAATGGGACAGCAACGAC <i>irp2</i> -R GCAGAGCGGATACGGAAAATGC	230 pb
<i>rmpA</i> (regulador del fenotipo mucoide)	<i>rmpA</i> -F ACTGGGCTACCTCTGCTTCA <i>rmpA</i> -R CTTGCATGAGCCATCTTCA	535 pb
<i>rmpA2</i> (regulador del fenotipo mucoide)	<i>rmpA2</i> -F CTTTATGTGCAATAAGGATGTT <i>rmpA2</i> -R CCTCCTGGAGAGTAAGCATT	450 pb

6.6 Electroforesis de los productos de PCR

Se comprobó la correcta amplificación de los genes mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 - 1.5% con un buffer de corrimiento TAE al 1%, en una cámara Cell GT (Biorad) a 100 volts por 45 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 µg/mL y se visualizaron en un Fotodocumentador. Se utilizó un marcador DNA Ladder de 1 kb para corroborar que el gen amplificado correspondía al peso molecular esperado.

6.7 Extracción y análisis de plásmidos

El análisis del perfil de plásmidos se realizó por el método Kieser (Kieser, 1984). Se toma de 1 a 3 colonias de cada una de las cepas de *Klebsiella* candidata para la transferencia plásmido con flouróforo y se siembra (por separado) en 5ml de medio LB con agitación lenta y se mantiene en incubadora overnight, se centrifuga el contenido y

se retira el sobrenadante para obtener una pastilla en el fondo del tubo, se le agrega la solución I (sacarosa 0.3 M; Tris HCl 0.025 mM; EDTA 25 mM y lisozima 0.5 gr/ml) (su función es preparar la membrana de las células para su posterior ruptura y liberación del material genético) y se mantiene en hielo durante 30 min. Después de este paso se le agrega la solución II (NaOH 5 M; SDS 10% y H₂O 3.7 ml) (la cual rompe la pared celular de la bacteria y se obtiene así el ADN) y se coloca a 55°C durante 30 min, posteriormente, se agrega fenol-cloroformo para separar contenido proteico usando agitación por vortex, y el contenido resultante se centrifuga a 14,000 rpm y se toman aproximadamente 400µL de sobrenadante que es puesto en otro tubo eppendorf el cual se mantiene a -20°C hasta ser utilizado.

El análisis del perfil de plásmidos se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en donde se coloca en cada uno de los carriles el contenido del aislamiento del proceso anterior, se deja correr durante 6 h (80 voltios a 4°C) y se tiñe con bromuro de etidio para observarse en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.8 Bacterias electrocompetentes

Se seleccionó una sola colonia de la cepa receptora de agar LB y se inoculó en un tubo con 5 ml de caldo LB, se mantiene a 37°C durante una noche, transcurrido este tiempo, se inoculó 250ml de caldo LB y se mantiene en agitación a 37°C y se mide la solución en espectrofotómetro a 600 nm hasta que se encuentre en el rango de 0.6 a 0.9. Cuando llegó a la densidad óptica deseada, se colocó el tubo en hielo durante 20 min. Después, se colocó 50 ml del contenido anterior en tubos y centrifugar a 4000 rpm durante 25 min a 4°C, se colocan los tubos en hielo, se removió el sobrenadante y se resuspendió en 25 ml de glicerol al 10%. Se centrifugó a 4000 rpm durante 25 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente con 10 ml de glicerol al 10%, centrifugar a 4000 rpm durante 25 min a 4°C. Al terminar se colocaron los tubos en hielo remover el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10%, y se prepararon alíquotas de 100 µl de este contenido en tubos eppendorf para posterior congelar a -80°C hasta que sean utilizadas.

6.9 Transformación de células competentes

Se colocaron las células competentes en un recipiente con hielo hasta descongelar y se adicionó la cantidad de DNA (plásmido a transferir) necesario para alcanzar una concentración de 20 ng/ml. Se mezcló suavemente (sin pipetear) desde arriba hacia abajo y mantener en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo se colocó el contenido en una celda para electroporación y conservar en hielo. Se colocó cuidadosamente la celda en electroporador. Se agregó 1 ml de caldo LB y se mezcló suavemente hasta resuspender. Se transportó el contenido a un tubo limpio e incubó con agitación a 37°C durante una hora. Se sembraron 100µl del contenido en cajas de agar que contengan el marcador de selección que nos permitió distinguir a aquellas bacterias que hayan recibido el plásmido.

6.10 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro en un líquido con células provenientes de un cultivo crecido previamente hasta la saturación.

Procedimiento:

Día 1.- por la tarde, se sembró en agar LB la cepa a la que se vaya a realizar la curva de crecimiento (siembra por estriado).

Día 2.- se esterilizó 1 tubo con 5ml de medio LB, 1 matraz con 25 ml de LB, tubos de ensayo vacíos. Por la tarde se inoculó el tubo con 5 ml de LB tomando una sola colonia de caja Petri. Se llevó a la incubadora (37°C , 100 rpm). Inicio de conteo de tiempo.

Transcurrida media hora, se sacó el matraz, se colocaron 2ml de la muestra en tubos estériles y se midió la D.O. a 620nm en espectrofotómetro. Se regresó el matraz y seguir contando tiempo. Se tomaron los tubos eppendorf con 90 µl de LB caldo y se tomaron 10 µl de tubo de ensayo al primer tubo para tener una dilución 10^{-1} y así sucesivamente. Se sembraron por medio de extensión en superficie las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y se realizó lo mismo para la hora 1, 2 y 3. Se llevaron las cajas a la incubadora a 37°C. Día 4.- se realizó el conteo de colonias.

6.11 Determinación del nivel de virulencia en un modelo murino

Para determinar el nivel de virulencia de las cepas transconjugantes o transformantes se realizó una infección en el modelo de ratón, con el objetivo de medir la tasa de mortalidad que está relacionada directamente con la patogenicidad de la bacteria.

La infección se llevó a cabo a partir de un cultivo de la bacteria transconjugante o transformante en medio LB que contenga solución EDTA 1 mM. Se lavó dos veces con PBS estéril y se centrifugó el contenido para tomar 5×10^4 UFC y se añadieron 200 ml de PBS. Se inocularon ratones hembra Balb/C de seis semanas vía intraperitoneal y se monitorearon por 14 días para observar cambios.

La descripción de la técnica se muestra a continuación:

- 1.- Con el ratón correctamente inmovilizado, se inclinó y trazó una línea imaginaria donde cruce el abdomen transversalmente justo sobre las rodillas.
- 2.- La aguja fue insertada sobre esta línea, en el lado derecho del ratón y lo más cercano posible a la línea que divide longitudinalmente el abdomen, con esto se disminuye el riesgo de inocular vejiga urinaria.
- 3.- La aguja alcanzó una profundidad en el ratón de aproximadamente medio centímetro y se realizó con una inclinación de 30° con respecto a la superficie del abdomen.
- 4.- Se aspiró para asegurar que no se alcanzó vaso sanguíneo o vejiga.
- 5.- Al asegurarse que ningún fluido fue aspirado, se procedió a la inyección de la muestra.
- 6.- Se retiró la aguja y se presionó ligeramente la zona de inyección.

Los ratones que sobrevivieron a la infección bacteriana fueron puestos en cámara de éter para su sacrificio, posteriormente todos los ratones del estudio se mantuvieron a -20°C y fueron entregados a la compañía que recolecta los RPBI contratada por el INSP. Estas pruebas se llevaron a cabo bajo las indicaciones específicas del bioterio del CISEI para el cuidado de los ratones.

6.12 Necropsia y obtención de tejidos

La necropsia a los ratones fallecidos se llevó a cabo con la ayuda de un médico veterinario experto, donde se realizó un corte vertical a lo largo del tórax y abdomen, posteriormente se observó cualquier alteración o daño a tejidos específicamente en hígado, vesícula, riñón y bazo.

6.13 Resistencia a suero humano

Se dejó un cultivo de caldo LB (5 ml) toda la noche previa a la realización del ensayo para cada una de las bacterias a analizadas. (37°C, agitación). Se tomaron 100 µl de los cultivos crecidos toda la noche previa y se inocularon tubos con 5ml de LB (hasta fase logarítmica temprana D.O: 0.600 - 0.900). El tiempo de crecimiento de la bacteria se basó de acuerdo con la curva de crecimiento previamente realizada. Se obtuvieron los sueros a partir de voluntarios sanos en el mismo día de la prueba. (Para obtener el suero, centrifugado a 4,000 x 10 min). Una vez que las bacterias alcanzaron la fase logarítmica temprana del crecimiento, se diluyeron hasta aproximadamente 2×10^6 cel/mL en PBS. Se colocaron 75 µL de pool de sueros humanos en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 25 µL de la suspensión bacteriana, se mezcló e incubó a 37° (lo cual se realizó por triplicado). La viabilidad bacteriana se determinó a las 0, 1, 2 y 3 horas de incubación. Después se tomaron 3 tubos y se mezclaron en uno solo. Las muestras son sometidas a diluciones seriadas (275 µL de PBS + 30 µL de la mezcla incubada) y se plaquearon las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} . Esto se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente se realizó el conteo de las placas.

Interpretación de ensayo

- Grado 1: conteo viable a la h 1 y 2 < 10% del inóculo inicial; a las 3 h < 0.1%.
- Grado 2: conteo viable a la h 1 del 10-100% del inóculo inicial; 3 h < 10%.
- Grado 3: conteo viable a la hora 1 >100%; de 2 a 3 h < 100% del inóculo inicial.
- Grado 4: conteo viable de la hora 1 a la 2 >100%; 3 h < 100% del inóculo inicial.
- Grado 5: 1, 2 y 3 h >100% del inóculo inicial, pero con decremento después de la tercer hora.

- Grado 6: 1, 2 y 3 h >100% del inóculo inicial aumentando después de la tercera hora.

Cada una de las cepas se evaluó por triplicado y se determinó la susceptibilidad de estas hacia el suero humano. En la figura 7 se muestra la clasificación de cada uno de los grados.

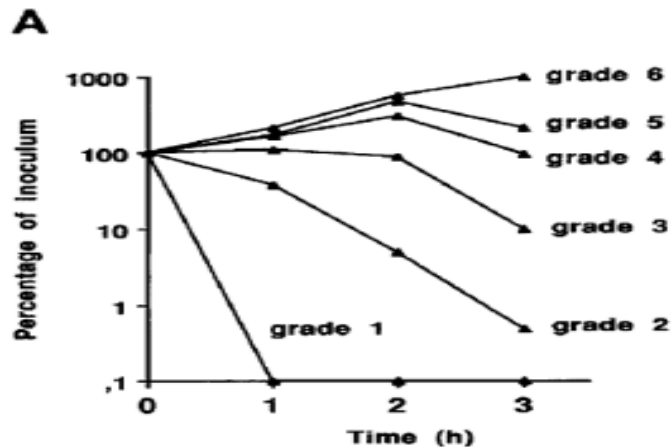


Figura.7 Representación de cada uno de los grados de resistencia a suero humano (Podschun et al., 1993).

6.14 Resistencia a la fagocitosis por neutrófilos y sobrevivencia a la muerte intracelular.

- Aislamiento y purificación de neutrófilos.

Se recolectaron diversas muestras sanguíneas en tubos con heparina de sodio como anticoagulante (BD Vacutainer) a partir de voluntarios sanos que no habían ingerido antibióticos al menos 7 días antes a la fecha de toma de muestra. El aislamiento de los neutrófilos se realizó utilizando un gradiente de densidad de Percoll. Este método resulta en la obtención de un gran número de neutrófilos purificados y no activados. De 50 mL de sangre se obtienen aproximadamente 108 células. Una vez que se ha extraído la sangre, se dispensan 7 mL de Hystopaque-1119 (Sigma Aldrich) en un tubo Falcon de 15 mL, posteriormente se agregaron cuidadosamente 7 mL de la sangre total de tal forma que no se mezclaran ambas fases. Enseguida, se centrifugó este tubo a 800 gravedades por 30 minutos con frenado lento. Una vez terminado el tiempo de

centrifugación, se desecharon las capas que contenían al plasma sanguíneo (capa superior amarillenta) y a los linfocitos/monocitos (capa blanquecina subsecuente) para finalmente coleccionar cuidadosamente con la ayuda de una pipeta Pasteur, la capa difusa rosácea donde se encontraban contenidos los neutrófilos. La capa rojiza inferior del tubo que contenía a los eritrocitos también fue desechada (Figura 8).

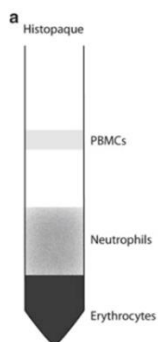


Figura. 8 Capas de células obtenidas después de la separación por centrifugación con Hystopaque67.

Una vez que se recolectaron los neutrófilos en un tubo Falcon nuevo, se realizaron lavados con solución salina balanceada de Hank 1X (HBSS por sus siglas en inglés) suplementada con suero fetal bovino para favorecer la opsonización bacteriana y se centrifugó a 300 gravedades por 10 minutos. Simultáneamente, se prepararon gradientes de Percoll pH 8.5 – 9.5 (Sigma Aldrich) en tubos Eppendorf de 2.0 mL de la siguiente manera:

*Tabla 4 Preparación de los gradientes de Percoll para el aislamiento y purificación de neutrófilos no activados. *El stock se prepara al agregar 9 mL de Percoll y 1 mL de HBSS 10X ó 1 mL de PBS 10 X*

Gradientes de Percoll			
Gradiente	Vol. HBSS 1X	Vol. Stock de Percoll*	Vol. Final
65%	0.7 mL	1.3 mL	2 mL
70%	0.6 mL	1.4 mL	2 mL
75%	0.5 mL	1.5 mL	2 mL
80%	0.4 mL	1.6 mL	2 mL
85%	0.3 mL	1.7 mL	2 mL

Una vez realizados los gradientes de Percoll, estos se agregaron cuidadosamente (para evitar que se mezclaran las fases) a un tubo Falcon de 15 mL, empezando por el gradiente que se encontraba al 85%, seguido del gradiente al 80% y así sucesivamente en orden decreciente hasta culminar con el gradiente que se encontraba al 65%. Finalmente se agregaron los neutrófilos previamente lavados en la parte superior del gradiente correspondiente al 65% y se centrifugó este tubo a 800 gravedades por 20 minutos, utilizando un programa de frenado lento de tal forma que no se mezclen los gradientes. Al terminar la centrifugación, se colecta la interfase ubicada entre la capa de Percoll del 70-75% en un tubo Falcon de 15 mL limpio (figura 9). Este tubo se llenó con PBS 1X y se centrifugó a 300 gravedades por 10 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en medio RPMI 1640 con HEPES y rojo de fenol (Thermo Fisher Scientific) y se determinó la concentración de neutrófilos.

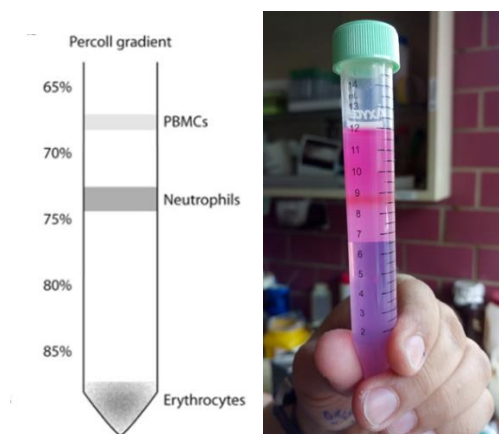


Figura 9. Gradientes de densidad de Percoll. En el dibujo de la izquierda se muestra la muestra la interfase en la cual se localiza los neutrófilos ya purificados⁶⁷. En la imagen de la derecha se muestra el característico “anillo de neutrófilos”, el cual es un claro indicador de que se han aislado y purificado adecuadamente los neutrófilos.

Infección de los neutrófilos con cepas

Para determinar la resistencia bacteriana a la fagocitosis mediada por neutrófilos se realizó el método descrito por Hampton y colaboradores. Una vez que se obtuvieron y purificaron los neutrófilos se procedió a realizar las infecciones de los neutrófilos con las cepas identificadas. A partir de un cultivo overnight de la bacteria a estudiar, se realizó una dilución 1:10 para inocular un tubo con 9 mL de caldo LB y este se incubó con agitación a 37° hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 0.8 a 600 nm. Una vez que la bacteria estuvo a la densidad óptica deseada, se realizaron las infecciones a una

multiplicidad de infección (M.O.I por sus siglas en inglés) de 1. Los neutrófilos se infectaron a la misma M.O.I para cada uno de los cuatro diferentes tiempos en los que se hicieron las mediciones, esto fue, a la hora 0, 0.5, 1 y 3. Una vez realizada la infección, se incubaron los neutrófilos con las bacterias por 10 minutos a 37° C. Al terminar este tiempo de incubación, esta mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el pellet se incubó a 37° C por 20 minutos. Una vez pasado este tiempo, el pellet se lavó tres veces con PBS conteniendo gentamicina (100 mg/mL). Cuando los lavados se realizaron, se agregó 1 mL de medio RPMI-Suero fetal bovino conteniendo gentamicina (100 mg/mL) y se incubó a los respectivos tiempos post-infección anteriormente indicados. Al terminar los distintos tiempos de infección, se centrifugó esta mezcla, se decantó el sobrenadante y el pellet se re suspendió en 200 mL de PBS-Tritón al 0.5% (V/V), se mezcló utilizando el vortex y se realizaron dos diluciones 1:10 (20 mL de PBS-Tritón-Bacteria y 180 mL de PBS). Ambas diluciones se plaquearon en una caja de agar LB con ayuda de un asa de distribución y estas se incubaron por toda la noche a 37° C. Al día siguiente se realizó el conteo de UFC/mL y se interpretaron los resultados. Las mediciones obtenidas de las horas 0, 0.5 y 1 nos indicó la capacidad de la bacteria de resistir o no a la fagocitosis por neutrófilos. La hora 3 nos indicó la capacidad de la bacteria de sobrevivir intracelularmente en el neutrófilo.

7.----- RESULTADOS -----

Las cepas seleccionadas para este estudio (*K. pneumoniae* 10271, *K. variicola* F2R9 y *K. variicola* TpF2R9) fueron identificadas previamente mediante PCR-multiplex, la cepa parental *K. variicola* F2R9 fue transformada en estudios anteriores obteniéndose *K. variicola* TpF2R9 la cual fue receptora del plásmido de virulencia pLPVK originario de *K. pneumoniae* 10271 (Figura 10) (Barrera Almanza, 2017).

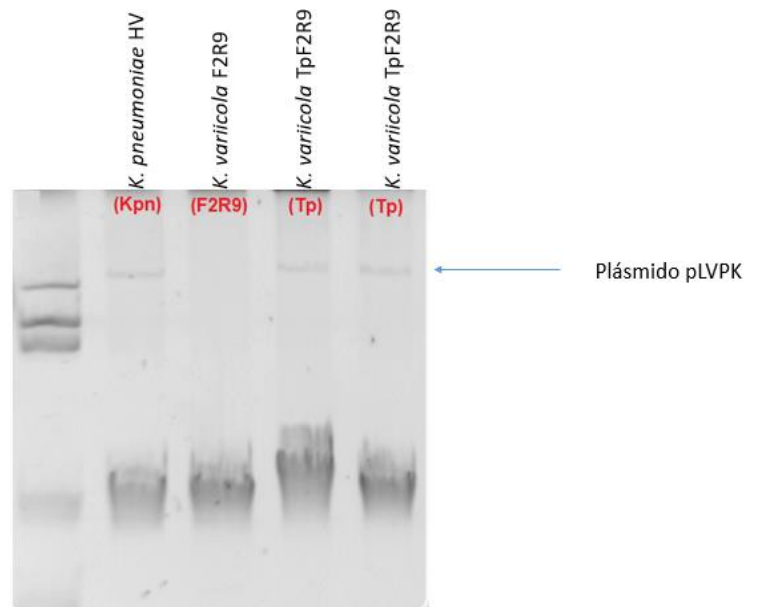


Figura 10 Extracción de plásmidos. Carril 1.- Marcador de peso (156, 66, 48 y 7 kb), carril 2.- *K. pneumoniae* 10271, carril 3.- *K. variicola* F2R9, carril 4.- *K. variicola* TpF2R9 (1), carril 5.- *K. variicola* TpF2R9 (2)

7.1 PCR factores de virulencia e hiper mucoviscosidad

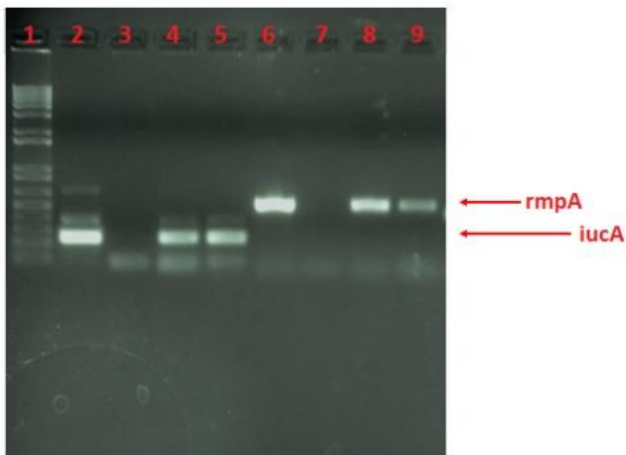


FIGURA 11 PCR *iucA* y *rmpA*. Carril 1. Marcador de peso molecular Carril 2. Positivo *iucA*. carril 3. Negativo *iucA*. carril 4. TpF2R9 carril 5. 10271 carril 6. Positivo *rmpA*. carril 7. Negativo *rmpA* carril 8. TpF2R9 carril 9. 10271

Mediante PCR se detectaron los factores de virulencia que están contenidos en el plásmido pLPVK, el cual se encuentra presente en la cepa 10271 y en la cepa transformante TpF2R9. En la siguiente figura se observan los productos de PCR para cada uno de los factores de virulencia (figura 11).

7.2 Ensayos *in vitro*

7.2.1 Resistencia suero humano no inmune

Se analizo la resistencia a suero humano no inmune del total de las cepas.

Se observa el grado de resistencia de cada cepa, en este caso podemos observar a las cepas 10271 grado 6 (resistente), F2R9 grado 3 (sensible) y TpF2R9 grado 6 (resistente) por lo que sabemos que el plásmido pLVPK en la cepa receptora TpF2R9 ha conferido el fenotipo hipermucoviscoso, que ha ayudado a su vez a la resistencia al suero humano específicamente el sistema de complemento debido a la producción de una hipercápsula (Figura 12).

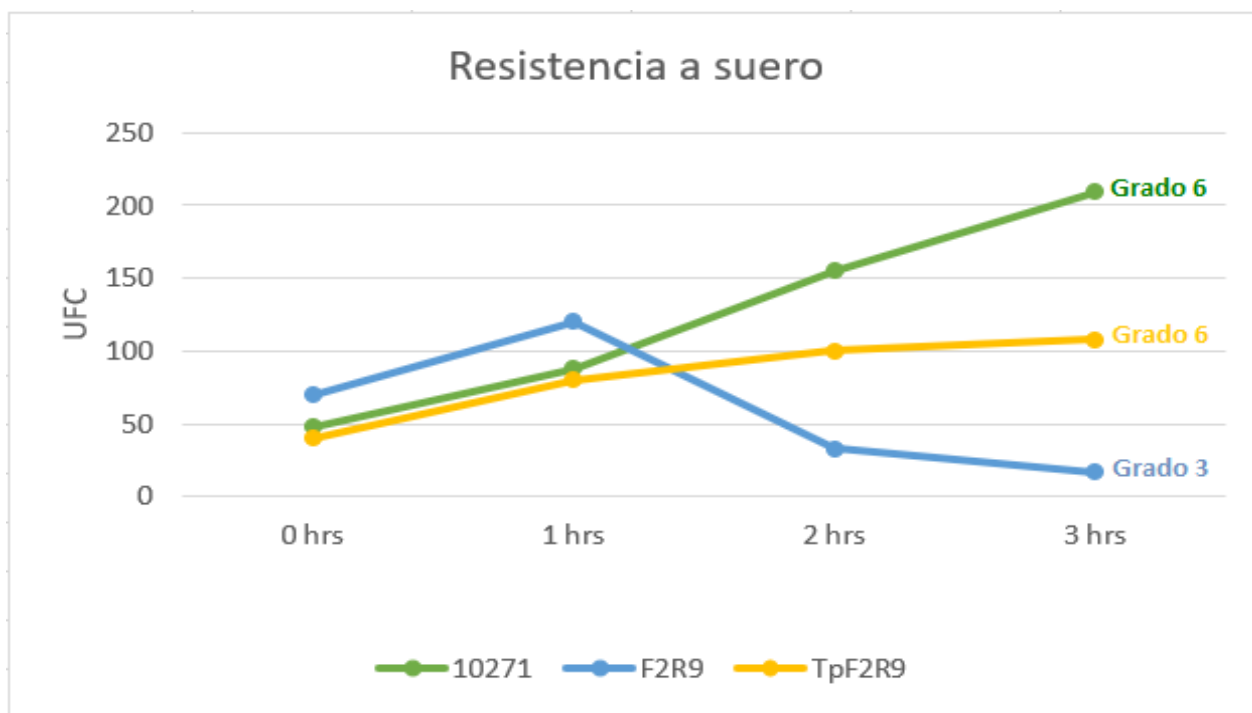


Figura. 12. Evaluación de resistencia a suero humano no inmune. Se muestra el grado de sensibilidad y resistencia respectiva a cada cepa.

7.2.2 Resistencia a fagocitosis por neutrófilos

El ensayo de resistencia a fagocitosis mostró que las cepas 10271 y TpF2R9 son resistentes a fagocitosis esto se pudo determinar durante los tiempos de 30 y 60

minutos, en este tiempo se observa la capacidad que presenta la cepa para evadir la fagocitosis o ser fagocitada.

La disminución de las UFC de las cepas durante los 30 min y 60 min es debido a la presencia de gentamicina en el medio, todas las bacterias que no fueron fagocitadas, por lo que el antibiótico eliminó a las bacterias del medio. En cambio, la cepa F2R9 mostró sensibilidad a la fagocitosis durante 30 y 60 minutos.

Durante la hora 3 se puede observar la capacidad del neutrófilo de inducir la muerte intracelular. En este caso las cepas 10271 y TpF2R9 son sensibles a muerte intracelular, en contraste, la cepa F2R9 a pesar de ser sensible a fagocitosis es resistente a muerte intracelular (Figura 13).

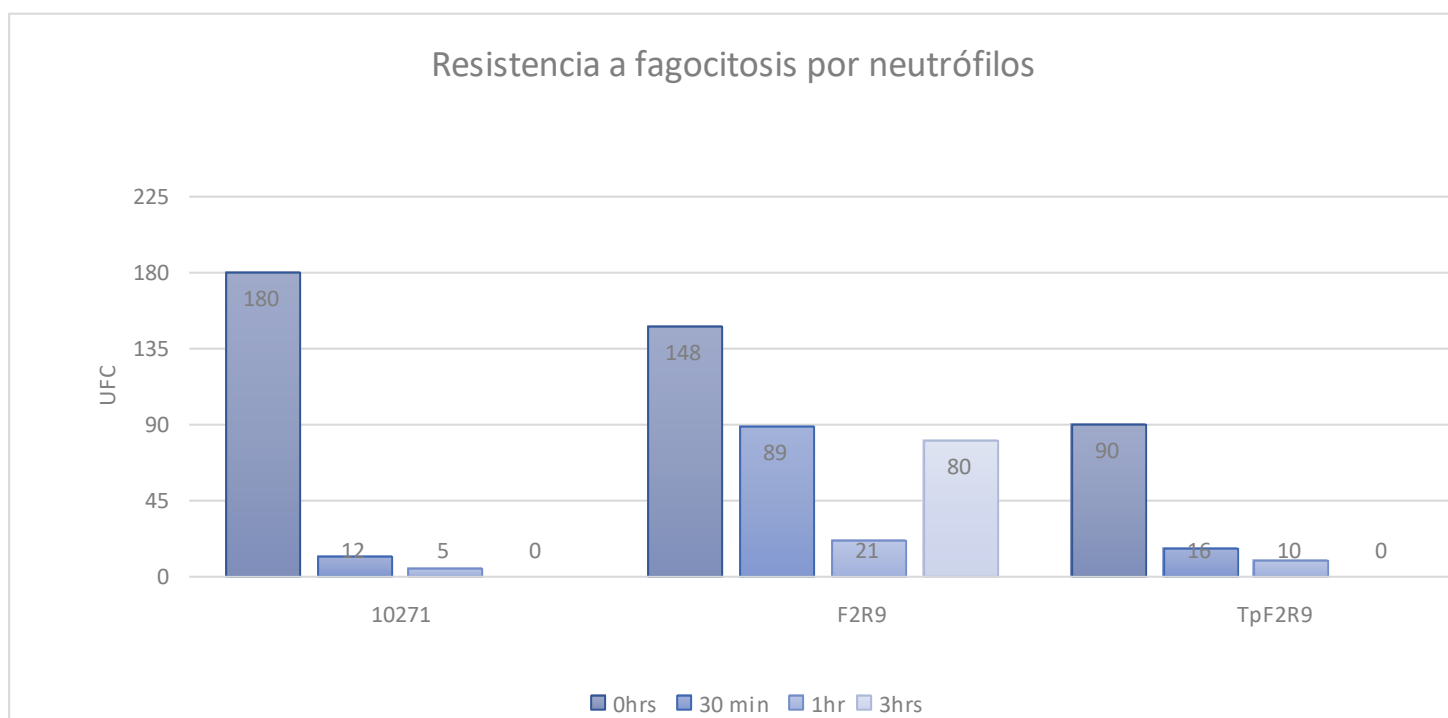


Figura. 13. Resistencia a fagocitosis por neutrófilos. Las cepas 10271 y TpF2R9 son resistentes a fagocitosis sin embargo son sensibles a muerte intracelular mientras que la cepa F2R9 aun siendo sensible a fagocitosis es resistente a muerte intracelular.

7.3 Ensayo *in vivo*

7.3.1 Determinación de nivel de patogenicidad en modelo murino

Se determinó el nivel de patogenicidad de la cepa *K. variicola* TpF2R9, se inocularon grupos de cinco ratones para probar distintas concentraciones de UFC tanto de la cepa parental como de la transformante.

En la gráfica se muestra el porcentaje de sobrevivencia de los tres grupos analizados de bacterias *K. variicola* F2R9, *K. variicola* TpF2R9 y *K. pneumoniae* 10271.

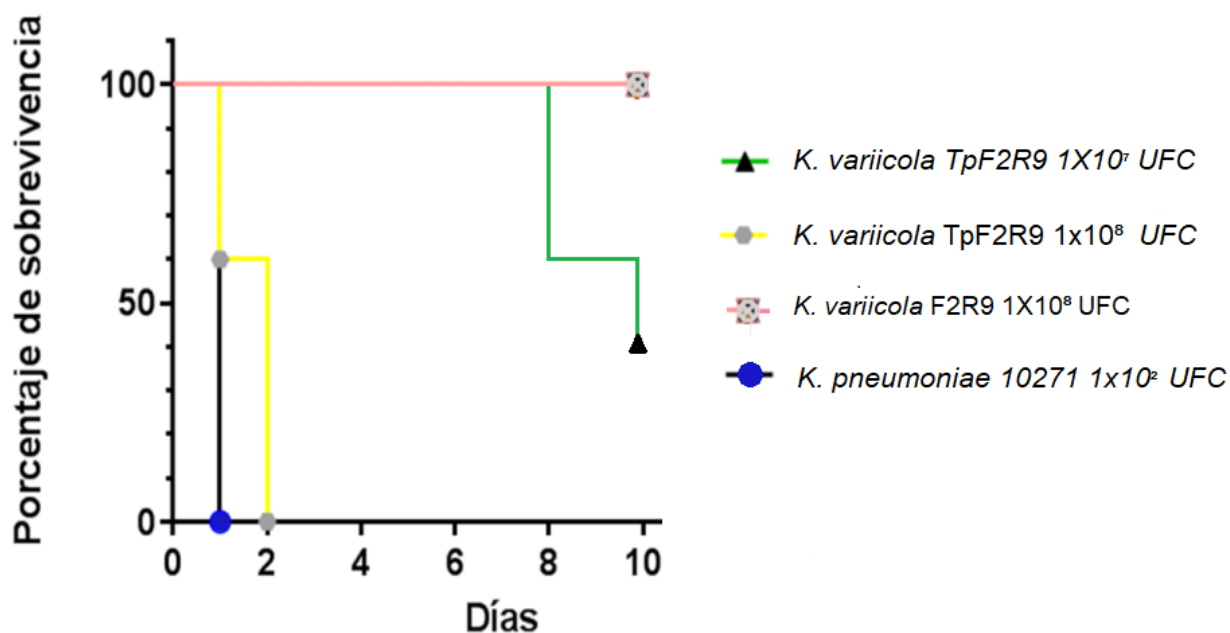


Figura. 14 porcentajes de sobrevivencia de ratones. Se muestra el porcentaje de letalidad de la cepa *K. variicola* en modelo murino.

Los estudios de letalidad mediante la inyección vía intraperitoneal muestra que para *K. pneumoniae* 10271 causa la muerte en ratón 100% a una dosis de 10^2 UFC a las 24h, lo que indica una alta patogenicidad mientras que para *K. variicola* TpF2R9 a la dosis 10^8 se observó letalidad del 40% en los ratones a las 24h y un 100% a las 48h. Para la dosis 10^7 se observó la muerte del 60% en ratones entre los días 8 y 10 mientras que hay un 100% de sobrevivencia para la dosis 10^6 hasta el día 10.

En el caso de la cepa parental *K. variicola* F2R9 no se observó mortalidad en los ratones para ninguna de las dosis administradas (10^6 a 10^8).

7.4 Necropsia y obtención de tejidos

Con base en los resultados que se obtuvieron de las pruebas, necropsia a los ratones y obtención de tejidos se creó una tabla con los datos, según el daño registrado se clasificaron desde (+) en daño menor hasta (++++) a daño severo observado en los órganos analizados, los cuales fueron: hígado, riñón, vesícula y bazo en los días 1, 2, 5 y 10 en todas las dosis de la cepa *K. variicola* TpF2R9 (10^6 a 10^8) (tabla 5).

Interpretación de valores		Interpretación de siglas	
+	Cambio de coloración	Hígado	H
++	absceso	Riñón	R
+++	absceso + ictericia	Vesícula	V
++++	Daño severo	Bazo	B
-	Sin daño		

Inóculo UFC

CEPA / DIAS	10^8				10^7				10^6			
	H	R	V	B	H	R	V	B	H	R	V	B
TpF2R9												
24h	++	++	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
48h	++	++	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
5d					+++	++	++	+++	+	-	+	+
10d					++++	+	++++	++++	+	-	-	-
F2R9												
24h – 10d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 5 evaluación de la patogenicidad de *K. variicola* TpF2R9. En la tabla se muestra en nivel de patogenicidad que se registró en Hígado (H), Riñón (R), vesícula (V) y Bazo (B) respectivamente para las dosis 10^8 , 10^7 y 10^6 UFC para los días 1, 2, 5 y 10.

Los resultados se desglosan a continuación:

Se observó que para la dosis 10^8 el total de los ratones fallecidos por la infección a las 24h y 48h presentaban absceso en hígado y pequeñas hemorragias en riñón, así como una coloración anormal en vesícula (imagen 1 y 2). Los resultados se ven resaltados en color rojo sobre la tabla de resultados (tabla 6).

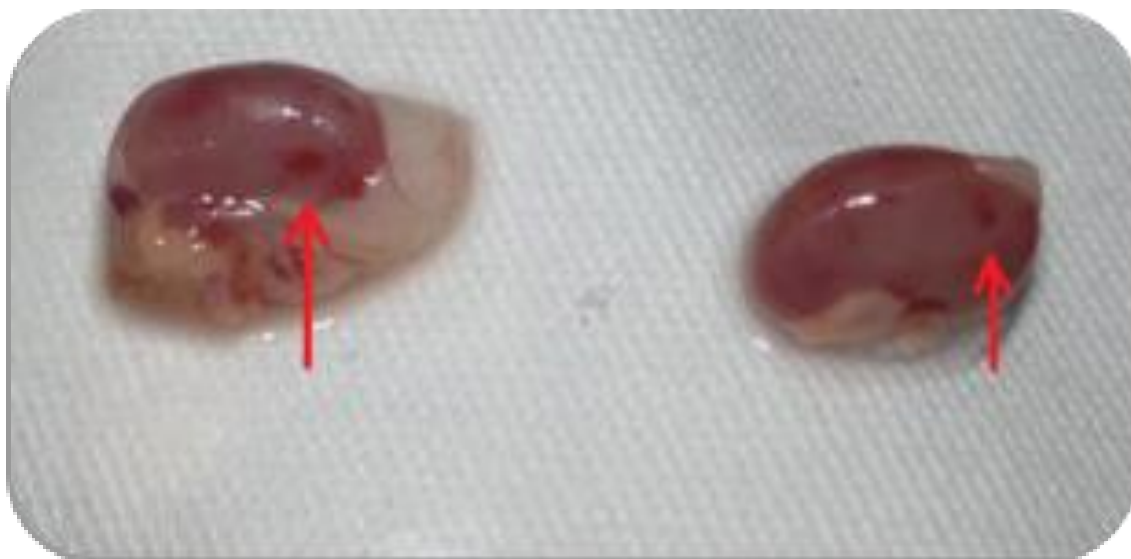


imagen 1 lesiones en riñón. El riñón mostró varias lesiones a manera de pequeñas hemorragias localizadas alrededor del órgano.



Imagen 2 Absceso hepático 10^8 UFC 48h. En la imagen se muestra un absceso hepático de tamaño considerable respecto al hígado, no se muestra mayor alteración o coloración anormal en tejido.

CEPA / DIAS	Inóculo UFC												
	10^8				10^7				10^6				
	H	R	V	B	H	R	V	B	H	R	V	B	
TpF2R9													
24h	++	++	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
48h	++	++	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
5d					+++	++	++	+++	+	-	+	+	
10d					+++	+	+++	+++	+	-	-	-	-
F2R9													
24h - 10d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Evaluación de la patogenicidad de *K. variicola* TpF2R9. En la tabla se muestra resaltado en color rojo la interpretación de resultados para hígado y riñones a las 48h.

Se registraron los resultados de los tejidos obtenidos el día 5 (Tabla 7). En los ratones inoculados con la dosis 10^7 a las 24h y 48h mostraban pocos abscesos de pequeño tamaño sin alteraciones mayores en vesícula ni en otros órganos, en el día 5 se encontró absceso en riñón y un severo daño en hígado destacando una coloración amarillo pálido con al menos un absceso de mayor tamaño, igualmente se pudo notar esta coloración en bazo que además presentaba un agrandamiento anormal, esto último probablemente debido a la respuesta inmune para combatir la infección (imagen 3 y 4).

CEPA/DIAS	Inóculo UFC											
	10^6				10^7				10^8			
	H	R	V	B	H	R	V	B	H	R	V	B
TpF2R9												
24h	++	++	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
48h	++	++	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
5d					+++	++	++	+++	+	-	+	+
10d					+++	+	+++	+++	+	-	-	-
F2R9												
24h-10d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Tabla 7. Evaluación de la patogenicidad de *K. variicola* **TpF2R9**. En la tabla se muestra resaltado en color rojo la interpretación de resultados para hígado, riñones y bazo a los 5 días

Imagen 3. Absceso renal. Se observa un absceso de tamaño considerable respecto al tamaño del riñón.

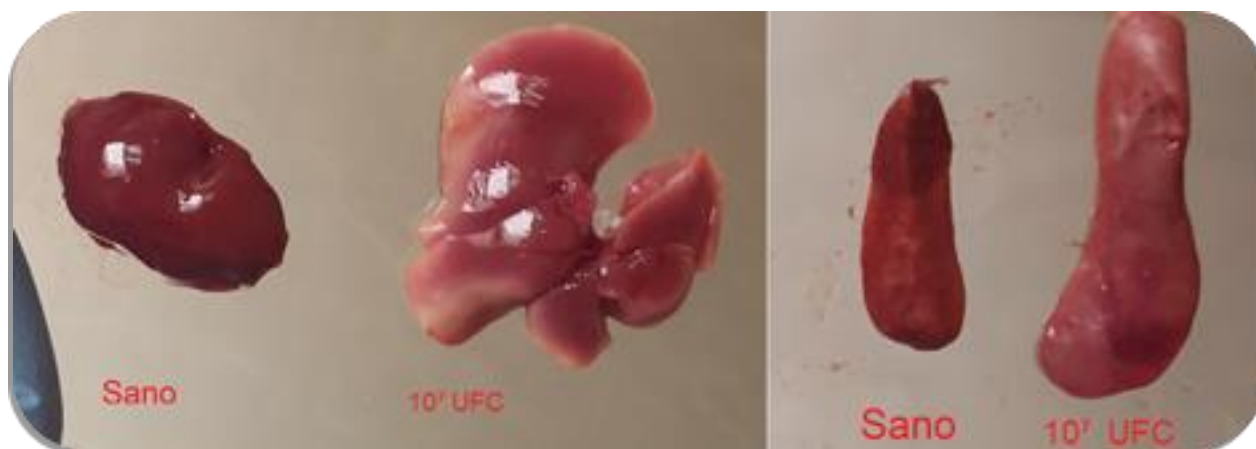


Imagen 4. Hígado y bazo dosis 10^7 día 5. Se muestra la comparativa de un fragmento de hígado sano (izquierda) y el que fue recuperado de ratón a los 5 días de infección, muestra una coloración anormal signo de un daño hepático e ictericia. En la imagen a la derecha se muestra un bazo sano vs bazo recuperado del mismo ratón donde se ve alterado el tamaño y su coloración.

El décimo día se observó una coloración negra en aproximadamente un 70% del hígado con dosis 10^7 , misma que se extendía a más de la mitad del bazo y agrandamiento de este (imagen 5 y 6). La vesícula presentaba la misma coloración y un tamaño mayor a lo normal, en riñón no se registró la presencia de abscesos sin embargo se pudieron observar unas pequeñas zonas con coloración diferente a la habitual, lo que podría ser signo de una lesión.

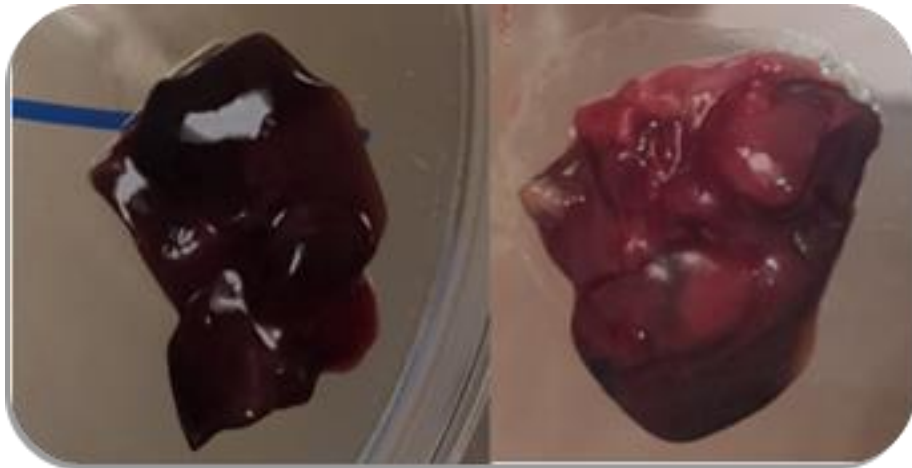


Imagen 5 Hígado 10^7 día 10. Se observa el hígado con un daño avanzado, la coloración negra anormal en tejido.



Imagen 6 Bazo 10^7 día 10. El bazo mostraba la misma coloración oscura que presentaba el hígado en aproximadamente el 50% del mismo, así como un agrandamiento anormal.

Se registró como daño severo debido a la coloración y estado del tejido del día 10 (tabla 8).

CEPA / DIAS	Inóculo UFC											
	10 ⁸				10 ⁷				10 ⁶			
	H	R	V	B	H	R	V	B	H	R	V	B
TpF2R9												
24h	++	++	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
48h	++	++	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
5d					+++	++	++	+++	+	-	+	+
10d					+++	+	+++	+++	+	-	-	-
F2R9												
24h - 10d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 8. Evaluación de la patogenicidad de *K. variicola* TpF2R9. En la tabla se muestra resaltado en color rojo la interpretación de resultados para hígado y bazo a los 10 días.

En el caso de los ratones que fueron inoculados con una dosis de 10⁶ para las 24h y 48h no se presentaron abscesos o daño visible, para el día 5 se observó un absceso de pequeño tamaño, en riñón no se observó ninguna alteración, el bazo se mostraba apenas de un tamaño mayor a lo normal. El décimo día se observó una recuperación en los signos de infección que presentaban los murinos tales como pelo encrespado, poca movilidad y respiración acelerada, al momento de examinar los órganos no se encontraron abscesos o alteración en riñones o bazo; sin embargo, el hígado se mostraba con una coloración anormal la cual puede deberse al daño crónico causado por la infección. Ninguno de los ratones murió a causa de la infección dentro del tiempo de este estudio (Imagen 7).



imagen 7. Comparativa de coloración en hígado. En la imagen se muestran 3 hígados, donde el primero (izquierda) denota una coloración normal mientras que el del centro tiene una coloración más oscura de lo normal, y el hígado de la derecha muestra una coloración más pálida de lo normal.

Este ensayo se realizó de la misma manera para la cepa parental *K. variicola* F2R9, en este caso no se pudo determinar un daño o alteración visible en los órganos para las 3 dosis (Imagen 8).



Imagen 8 órganos sin alteración inoculado con K. variicola F2R9. En la imagen se muestran los órganos sin alteraciones, abscesos o daño visible de ratón inoculado a una dosis de 10⁸ UFC de *K. variicola* F2R9

7.5 Comprobación de especie y factores de virulencia mediante PCR

7.5.1 PCR MULTIPLEX

Se tomaron muestras de hígado y vesícula de ratón inoculado con una dosis de 10^7 UFC al día 5, para la dosis 10^6 se tomó únicamente muestra de hígado. Las colonias sembradas dieron string test positivo, se les realizó PCR multiplex que confirmó que el total, de las cepas pertenecen a la especie *K. variicola* (Figura 15).

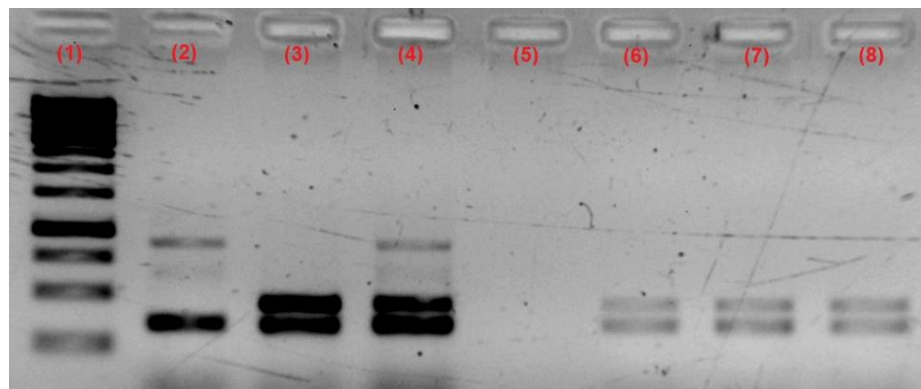


Figura. 15 PCR multiplex. Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. Positivo *Kpn*. Carril 3 positivo *Kv*. Carril 4 positivo a *Kpn* y *Kv*. Carril 5 negativo. Carril 6 Hígado 10^7 día 5. Carril 7 vesícula 10^7 día 5. Carril 8 Hígado 10^6

7.5.2 PCR para factores de virulencia *rmpA* - *iucA*

Se identificó que las cepas contenían *rmpA* factor responsable de conferir el fenotipo mucoso, el gen *iucA* también se encontraba presente, factor de virulencia con un papel importante en el proceso de infección (figura 16).

Ambos factores de virulencia se encuentran contenidos en el plásmido pLVPK.

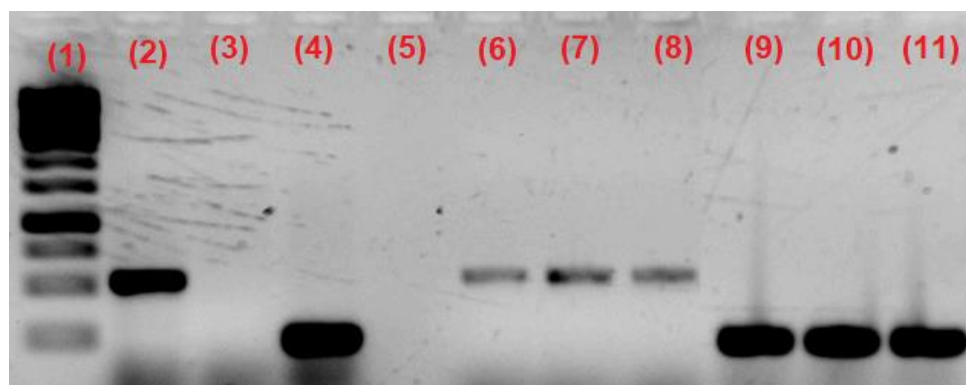


Figura. 16 identificación de factores de virulencia *rmpA* - *iucA*. Carril 1 Marcador de peso molecular Carril 2 positivo *rmpA* Carril 3 negativo Carril 4 positivo *iucA* Carril 5 negativo Carril 6 Hígado 10^7 día 5. Carril 7 vesícula 10^7 día 5. Carril 8 Hígado 10^6 Carril 9 Hígado 10^7 día 5. Carril 10 vesícula 10^7 día 5. Carril 11 Hígado 10^6

7.5.3 ERIC-PCR

La relación clonal se determinó en la cepa parental y en la cepa recuperada de órganos (Figura 17).

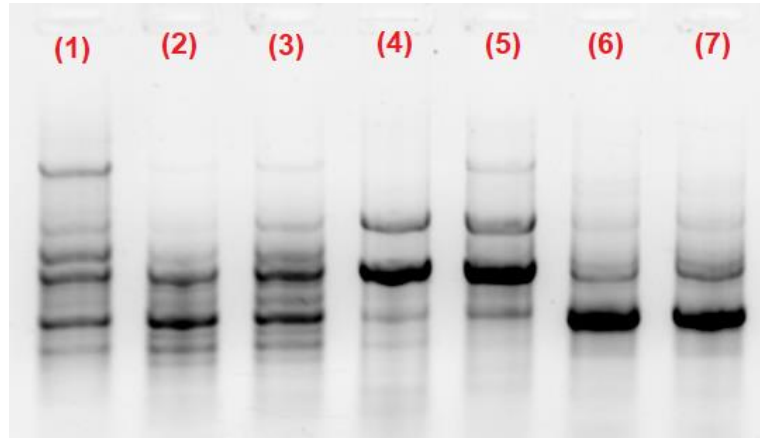


Figura. 17 Eric-PCR. Carril 1 F2R9. Carril 2 hígado. Carril 3 vesícula Carril 4 hígado. Carril 5 TpF2R9. Carril 6 10271 Carril 7 10271

8.- Discusión

Las enterobacterias comprenden universalmente el 50% de los aislados encontrados en infecciones adquiridas en los hospitales y 80% de todos los aislados Gram-negativos. Dentro de esta familia, el segundo género en importancia es *Klebsiella spp.*, siendo *K. pneumoniae* la especie más estudiada y de mayor relevancia clínica (Echeverri-toro, et al. 2010). Alrededor del mundo el interés en el género *Klebsiella* se debe a que además de ser un causante de IAAS, recientemente se le ha relacionado con casos importantes de incremento en la resistencia bacteriana y virulencia, lo que constituye un desafío en las instituciones de salud al causar brotes hospitalarios en diferentes continentes con aumento en la morbi-mortalidad. En Latinoamérica se plantea que el 30 % de las neumonías son causadas por *K. pneumoniae* (Dianelys et al., 2014).

La producción de adhesinas por *Klebsiella* favorece la colonización, lo que predispone al desarrollo de diferentes infecciones como bacteriemia, neumonía adquirida en la comunidad y meningitis. El síndrome de absceso hepático (SAH) es una reacción secundaria en el organismo por causa de *K. pneumoniae*. Uno de los principales factores de riesgo para desarrollarlo es la diabetes mellitus (Carrillo-esper et al., 2013). El SAH se manifiesta con fiebre y malestar general, en el 50% de los casos con ictericia, hepatomegalia y dolor en el cuadrante superior derecho. Entre los rasgos que distinguen a este síndrome se encuentran sus complicaciones, de las que destacan la bacteriemia y las infecciones metastásicas, que se presentan del 10-13% de los casos, y son de especial gravedad la endoftalmitis, abscesos cerebrales y meningitis, pero también se han descrito fascitis necrotizante e infección de la pared gástrica.

Las cepas de *K. pneumoniae* causantes del SAH se caracterizan por ser hiperproductoras de polisacáridos, lo que les da una característica especial de hipermucosidad, la cual también ayuda a la resistencia fagocitosis por neutrófilos y resistencia a suero no inmune (Fang et al., 2004). Los serotipos de *Klebsiella* causantes de este síndrome son principalmente los K1 y en menor grado K2. El fenotipo hipermucoviscoso del serotipo K1 de *K. pneumoniae* es mediado por un gen asociado a

mucoviscosidad (*magA*, recientemente renombrado *wzy*), que es fundamental para la síntesis de la red de exopolisacáridos. Este gen se localiza en el operón capsular de síntesis de polisacáridos (*cps*). El regulador de fenotipo mucoide (*rmpA*) es el activador transcripcional del locus *cps wzy*, mecanismo molecular que amplifica la síntesis de polisacáridos en el serotipo K1 de *K. pneumoniae*. La patogenicidad del serotipo K1 de *K. pneumoniae* está determinada no solamente por la expresión del gen *wzy* y la consecuente hiperproducción de polisacáridos, sino también por la expresión del gen de aerobactina. La aerobactina, considerado de los principales sideróforos para el desarrollo de la infección, es un sideróforo que mantiene un flujo constante de hierro a la bacteria, mecanismo que incrementa 100 veces su letalidad (Russo et al., 2015). De esta manera, *Klebsiella* no solo evita la fagocitosis por polimorfonucleares y la acción del complemento por la presencia de los polisacáridos, sino que es más activa y letal al tener un aporte asegurado de hierro; estos mecanismos se han implicado en la patogenicidad de este serotipo y en el desarrollo del SAH. Es importante mencionar que la mayoría de las cepas de *Klebsiella* causantes del SAH son sensibles a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos. El SAH es una infección emergente adquirida en la comunidad o ambiente hospitalario, poco frecuente, pero que deberá tomarse en cuenta en el diagnóstico de aquellos pacientes que presenten bacteriemia intensa e infección metastásica y que en los cultivos desarrollen *K. pneumoniae* con fenotipo hipermucoviscoso (Carrillo-esper et al., 2013).

Dentro del género *Klebsiella* una de las especies estrechamente relacionada a *Klebsiella pneumoniae* es *Klebsiella variicola*, especie recientemente descrita y que hasta hace poco era erróneamente reportada como *K. pneumoniae* de aislamientos clínicos debido a su gran parecido bioquímico.

Klebsiella variicola se describió como un endófito de plantas no patógeno. Sin embargo, se le comenzó a relacionar a altos grados de mortalidad en casos de bacteriemias.

A pesar de que *K. variicola* se considera generalmente que es menos virulenta que *K. pneumoniae*, un reciente estudio a gran escala reveló que *K. variicola* con frecuencia causa infecciones potencialmente mortales graves similares a *K. pneumoniae*. No

obstante, la virulencia de *K. variicola* sigue siendo en gran medida sin caracterizar, pero podría ser similar a la de *K. pneumoniae*.

Aunque no se tienen muchos estudios sobre la virulencia de *K. variicola*, actualmente han surgido reportes alrededor del mundo clasificando cepas de *K. variicola* hipervirulenta. Tal es el caso de una cepa de *Klebsiella variicola* reportada en Bangladesh, causante de un brote de sepsis neonatal con una alta mortalidad (54,5%) en recién nacidos menores a 30 días de edad, se desconocen aún los factores de virulencia que confirieron a la bacteria su alta patogenicidad dado que los sideróforos (yersiniabactina, aerobactina y salmochelina) estaban ausentes en esta cepa. No obstante, se sabe que esta cepa posee un plásmido con *bla*NDM-1 y *bla*CTX-M-15 que confieren una alta resistencia a antibióticos (Farzana et al., 2019). En contraste a este reporte que reporta resistencia a antibióticos existe un estudio en el que se registra una cepa de *K. variicola* hipervirulenta donde se demuestra que *Klebsiella variicola* ha sido capaz naturalmente de adquirir un plásmido que le confiera virulencia y resistencia a colistina, pero es susceptible a amikacina, aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina, imipenem, meropenem, sulfametoxazol y tigeciclina.

Así como el plásmido pLVPK (originario de *K. pneumoniae*) el plásmido pVir_030666 reportado en la cepa *K. variicola* WCHKV030666 contiene los genes de virulencia (*rmpA*, *rmpA2*, *fyuA*, *iucABCD*, *iutA*, *iroBCDN*, *irp1*, *irp2* y *ybtAEPQSTUX*), a excepción del gen que codifica para yersiniabactina que no está presente en el plásmido pLVPK (Lu et al., 2018).

La adquisición de este plásmido demuestra la existencia de cepas de *K. Variicola hipervirulentas* como es el caso de la cepa transformante que fue objeto de estudio para este proyecto.

La cepa transformante *Klebsiella variicola* TpF2R9 con el plásmido pLVPK demostró un comportamiento similar a *K. pneumoniae* 10271 en los ensayos *in vitro* ya que al ser expuesta a suero humano no inmune ésta obtuvo una mayor resistencia en comparación a la cepa parental F2R9 la cual es altamente susceptible a suero. De igual

manera al ser retada a la fagocitosis por neutrófilos *K. variicola* demostró una mayor resistencia a fagocitosis, esto probablemente se deba a la sobreproducción de exopolisacáridos, característica conferida por el gen regulador de fenotipo mucóide *rmpA* y *rmpA2* presente en el plásmido *pLVPK*. Aunque *K. variicola* TpF2R9 obtuvo una mayor resistencia a fagocitosis también se incrementó su sensibilidad a muerte intracelular, comportamiento muy similar a *K. pneumoniae* 10271 mientras que para *K. variicola* F2R9 a pesar de ser altamente susceptible a fagocitosis se registró resistencia a muerte intracelular.

Por otra parte, los experimentos de patogenicidad en modelo de ratón demostraron que la cepa *K. variicola* TpF2R9 al tener el plásmido con los factores de virulencia *iucA*, *rmpA* y *rmpA2* tuvo la capacidad de matar a los ratones a las 24h y 48h, aunque requiere concentraciones mucho mayores de UFC a las que requiere *K. pneumoniae* para la misma tasa de letalidad.

Por medio de la necropsia realizada a los ratones fallecidos se pudo determinar el papel de patogenicidad que tiene *K. variicola* TpF2R9 con un plásmido obtenido de *K. pneumoniae*, lo cual nos puede dar una idea del proceso de infección que tendrán las cepas que obtengan factores de virulencia naturalmente como es el caso de la cepa *K. variicola* WCHKV030666 mencionada anteriormente.

Durante los días estudio se pudo observar un comportamiento similar mas no igual de *K. variicola* TpF2R9 vs. *K. pneumoniae* 10271. Se inoculo una dosis de 10^2 UFC de la cepa 10271 donde se pudo observar en los ratones fallecidos a las 24h un absceso hepático, aunque no se mostraba mayor daño en otros órganos, mientras que para la cepa TpF2R9 a una dosis de 10^8 a las 24h se observó por igual un absceso hepático además de lesiones en riñones a manera de hemorragias, esto puede deberse a el papel que juegan las fimbrias de *K. variicola* en el proceso de infección.

Durante los días siguientes del estudio se evaluaron las dosis 10^7 y 10^6 , donde para el primer caso a las 24h y 48h se notaba el temprano desarrollo de abscesos hepáticos y

renal, para el día 5 se pudo observar como el daño hepático había avanzado causando ictericia en el sujeto, absceso hepático y renal, así como un agrandamiento de bazo probablemente debido al intento por compensar la infección mediante la respuesta inmune. Para el día 10 el sujeto de prueba presentaba un daño grave en hígado, vesícula, bazo y riñón con aparentemente necrosis en tejido, esto pudo deberse al daño crónico o en una falla multiorgánica debido a una sepsis causada por la evolución de la infección.

Para la dosis 10^6 se observó una notable diferencia en la letalidad y patogenicidad de la cepa, los ratones enfermaron y mostraron signos de haber contraído la infección sin embargo el daño en órganos era menor que el registrado para las dosis 10^8 y 10^7 .

Se encontró un absceso de tamaño pequeño en comparación a los encontrados en otras dosis, a pesar de esto el ratón se recuperó para el día 10 no mostraba signos externos de enfermedad, pero al examinar sus órganos se determinó que existía un daño en el tejido hepático debido a su coloración, esto pudiera deberse en el daño causado por la bacteria a pesar de una aparente recuperación.

Al finalizar el estudio *in vivo* las muestras seleccionadas (hígado y vesícula 10^8 ictericos, hígado con absceso 10^6) fueron sometidas a análisis mediante PCR donde se determinó que la bacteria causante de la infección y que fue recuperada de los órganos se tratase de *K. variicola* TpF2R9, mediante PCR multiplex y ERIC-PCR se pudo comprobar que se trataba de la misma que fue inoculada a ratón y no adquirida de otros medios.

El PCR para factores de virulencia, a su vez, ayudo a corroborar que la bacteria contara aun con los genes que codifican para hiper mucoviscosidad y para sideróforos esenciales en el proceso de infección, con papel importante en la patogenicidad de la cepa, en este caso específico la aerobactina que se ha descrito como el sideróforo con mayor importancia para el éxito de la infección (Russo et al., 2015). Lo cual nos indica que la cepa TpF2R9 fue capaz de mantener el plásmido *pLVPK* estable durante el proceso de infección.

9.- Conclusión

En conclusión, el estudio se centró en determinar el mecanismo de infección de *Klebsiella variicola* TpF2R9 en un modelo murino. A través de una serie de objetivos particulares, se exploró la patogenicidad de esta cepa tanto *in vitro* como *in vivo*. Se observó que, aunque históricamente se ha considerado a *K. variicola* como menos virulenta que *K. pneumoniae*, estudios recientes sugieren que puede causar infecciones graves y potencialmente mortales. A través de experimentos *in vitro*, se demostró que la cepa transformada de *K. variicola* TpF2R9, portadora de un plásmido con genes de virulencia, exhibió resistencia a la fagocitosis por neutrófilos y capacidad para matar a los ratones en un modelo murino.

Los resultados de los experimentos *in vivo* revelaron una progresión de la infección, con daño hepático y renal significativo, así como la presencia de abscesos en diferentes órganos. La dosis de inoculación afectó la letalidad y patogenicidad de la cepa, con dosis más altas causando un daño más severo. El análisis molecular confirmó que la cepa recuperada de los órganos infectados era de hecho *K. variicola* TpF2R9 y que mantenía los genes de virulencia, incluida la capacidad para producir sideróforos esenciales para la patogenicidad.

En resumen, este estudio proporciona una comprensión más profunda del potencial patogénico de *K. variicola* adquirir plásmidos de virulencia; y sugiere que esta especie podría ser capaz de causar infecciones graves, lo que destaca la importancia de investigar y comprender mejor la virulencia de esta bacteria emergente.

Parece inevitable que la aparición de cepas hipervirulentas de *K. variicola* lo cual conllevara un reto para la salud pública.

10.- Perspectivas.

Estudio de mecanismos de transmisión y epidemiología: Una vez determinado el mecanismo de infección en *K. variicola* TpF2R9 en modelos murinos, sería crucial investigar cómo estas cepas se transmiten en entornos clínicos y comunitarios. Se debería realizar un seguimiento epidemiológico para comprender mejor la propagación de cepas hipervirulentas y su impacto en la salud pública.

Identificación de nuevos factores de virulencia: A medida que se profundiza en el estudio de la virulencia de *K. variicola*, es importante identificar posibles nuevos factores de virulencia que puedan contribuir a su patogenicidad. Esto puede incluir la búsqueda de genes adicionales en plásmidos o cromosomas bacterianos que puedan estar implicados en la virulencia y resistencia a los antibióticos.

Desarrollo de estrategias de prevención y control: Basado en los hallazgos de este estudio y futuras investigaciones, se deben desarrollar estrategias de prevención y control dirigidas a reducir la transmisión de cepas hipervirulentas de *K. variicola*. Esto puede incluir medidas de control de infecciones en entornos de atención médica y campañas de concientización sobre la importancia de la higiene y el uso adecuado de antibióticos.

Vigilancia continua de la resistencia antimicrobiana: Es esencial mantener una vigilancia continua de la resistencia antimicrobiana en cepas de *K. variicola*, especialmente en lo que respecta a la adquisición de genes de resistencia a antibióticos. Esto ayudará a informar las decisiones de tratamiento clínico y de salud pública relacionadas con el uso de antibióticos.

Referencias

- Barrera Almanza, S. C. (2017) *Transferencia de factores de virulencia mediados en plásmidos en Klebsiella variicola y Klebsiella quasipneumoniae subsp. Similipneumoniae* (Tesis de maestría) Instituto Nacional de Salud Pública, México.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00973.x>
- Carrillo-esper, R., Díaz-carrillo, M. A., & Peña-pérez, C. (2013). *Caso clínico Síndrome de absceso hepático secundario*, 533–536.
- Catalán Nájera, J. C. (2017) *Identificación y caracterización genética de cepas de Klebsiella pneumoniae hipervirulentas (hipermucoviscosas) aisladas en diversos hospitales de México* (Tesis de doctorado) Instituto Nacional de Salud Pública, México.
- Chen, Y. T., Chang, H. Y., Lai, Y. C., Pan, C. C., Tsai, S. F., & Peng, H. L. (2004). *Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of Klebsiella pneumoniae CG43*. *Gene*, 337(1–2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.008>
- Dianelys, D., Pérez, Q., Yenisel, I. D., Cartaya, C., Illas, A. Z., Téc, I. I., ... Dra, V. I. (2014). *Resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de Klebsiella spp. y producción de B-lactamasas de espectro extendido en hospitales de Cuba* *Antimicrobial resistance observed in clinical Klebsiella spp isolates and extended spectrum B lactamases in Cuban hospitals*, 66(3), 386–399.
- Echeverri-toro, L. M., Rueda, Z. V, Maya, W., Agudelo, Y., & Ospina, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae multiresistente, factores predisonantes y mortalidad asociada*, 175–182.
- Fang, C., Chuang, Y., Shun, C., Chang, S., & Wang, J. (2004). *A Novel Virulence Gene in Klebsiella pneumoniae Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications*, 199(5). <https://doi.org/10.1084/jem.20030857>
- Farzana, R., Jones, L. S., Rahman, M. A., Andrey, D. O., Sands, K., Portal, E., ... Walsh, T. R. (2019). *Outbreak of Hypervirulent Multidrug-resistant Klebsiella variicola Causing High Mortality in Neonates in Bangladesh*. *Clinical Infectious Diseases*, 68(7), 1225–1227. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy778>
- Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Rodriguez-Medina, N., Martínez-Barnetche, J., & Andrade, V. (2015). *Draft Genome Sequence of the First Hypermucoviscous Klebsiella variicola Clinical Isolate*. *Genome Announcements*,

3(2), e01352-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01352-14>

- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1), 19–36. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0147-619X\(84\)90063-5](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0147-619X(84)90063-5)
- Lossa, G., & Lossa, M. (2011). *Klebsiella pneumoniae* organismos productores de carbapenemasas (KPC).
- Lu, Y., Feng, Y., McNally, A., & Zong, Z. (2018). Occurrence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella variicola*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(11), 3001–3004. <https://doi.org/10.1093/jac/dky301>
- Matsen, J. M., Spindler, J. a, & Blosser, R. O. (1974). Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Applied Microbiology*, 28(4), 672–8.
- Martínez-Romero, E., Rodríguez-Medina, N., Beltrán-Rojel, M., Toribio-Jiménez, J., & Garza-Ramos, U. (2018). *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* with capacity to adapt to clinical and plant settings. *Salud Publica de Mexico*, 60(1), 29–40. <https://doi.org/10.21149/8156>
- Martínez-Romero, E., Rodríguez-Medina, N., Beltrán-Rojel, M., Silva-Sánchez, J., Barrios-Camacho, H., Pérez-Rueda, E., & Garza-Ramos, U. (2018). Genome misclassification of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* isolated from plants, animals and humans. *Salud Publica de Mexico*, 60(1), 56–62. <https://doi.org/10.21149/8149>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Puerta-García, E. A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
- Reyna flores, F. L. (2016) *Identificación y analisis comparativo entre Klebsiella variicola y Klebsiella pnumoniae en aislamientos clinicos y ambientales* (Tesis de maestria) Universidad Autonoma del Esatado de Morelos, México
- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., & Martínez-Romero, E. (2004). *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 27–35. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00261>
- Russo, T. A., Olson, R., Macdonald, U., Beanan, J., & Davidson, A. (2015). *Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin Enables the Growth / Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae Ex Vivo and In Vivo*,

83(8), 3325–3333. <https://doi.org/10.1128/IAI.00430-15>

Shon, A. S., Bajwa, R. P. S., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>

Siu, L. K. K., Huang, D. B., & Chiang, T. (2014). Plasmid transferability of KPC into a virulent K2 serotype *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-176>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Seretraría de Extensión

Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 20 de marzo del 2024

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES

P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. RAMOS SANTIN JESSICA JANET**, con el título del trabajo: **Evaluación de la patogenicidad de la cepa *Klebsiella variicola* TpF2R9 en modelo murino**. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Atentamente

Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: DR. JOSÉ DE JESÚS ARELLANO GARCÍA

VOCAL: DR. JESÚS ULISES GARZA RAMOS MARTÍNEZ

SUPLENTE: DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO

SUPLENTE: DR. JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) 2 de abril 2020

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular

Sello

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2024-03-20 21:44:03 | Firmante

WYMqW0922DS9dhH/Xc+AsFLNmc6iDr6uvOAoRJoYJAJG9M1CzO9FeCQCM08JfG+Mtf2oxGmr0l8/a7Fi8s8p4fLFFU0v5YZZJeBaRjNhO2ZNPpZlilLkPcPMuK+Az6EyiiboBuBtG2j0GR9hsMFu05ku/2ybsNjJl+laR8gN2RmVUnQOvUkCcEP8DuvaKI4Qhc9ctzJCQfu3slep8HxAmOvkDwaJixF8n42gwpvV9Q9qvbpP2eiVGSg2mD9TRq3t74P/aqqX5jTYMubSnmPCocaqHs57iVF4lnerhdH4v2JnDGYU4EYzdOrE6YTpqxkZINnpWguUJQ4Pq+dCenT+HQ==

JESÚS ULISES GARZA RAMOS MARTÍNEZ | Fecha:2024-03-21 10:02:32 | Firmante

HIWIO2aeBCmJVDP9RrOrQKKEx/UzEo4jym6al3dBKwMfHtnJggJAv6+auK8TJyng9uJEO+R3wNMDsKx0sUUacSF6lLwsuRGVfAlJSC5ejzbrcy1RAKJWWrd+I0TzEA8Bol8k/yR9hhf5YYEqiMCSQ33ZLQGapKAeSXch5dfIukzU+sE9ZmDUPiFIA2emf+8wBbNP6k0s13mUyekOwJMSZ1BwqR8PPujQ7/3FDR3ZSmzNxl3KWYF8iM3IXDnllkPmeoZB/qWqHb5On3Oco/mYciwYUpFcx08ZLJWPVHK+E1+4mMUSkAP+xfEzVelk5ORXDgghAjENpez+02xb0+Q==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2024-03-21 14:16:40 | Firmante

nniOGYAHCtCuuluHRvXukqIfG5j5DThwddC7eRIRCsElXJVZqpMkpXr/zljcc+e28CUvSGRnOQDnYO2J7VW60pucCi0Hm/AjYil8B9Eg8p2XlpG+vtwwk8e/dBddFqWod6/4qr5IemMchH92wlHiefgs35F4p5O8x08WuHp/cLBLuQQ2HLGiJEkTDUn2eSEvXVDijV3CjEjEqsv6guaRViCixS+Wps3jcwGiLnumMel9fLSQBsQqu9zVzekeizp5jOyJ4CeGDsRW+Dtgeofv09uUGDYCQfZ24yD/HQK7oJnLfiPtb/9PrJ6JCKsFdRTNnwGEsSeZsNAWBCWlp3pw

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2024-03-21 14:40:46 | Firmante

VMYk8bA19oiBK3CZm0P9egbnzbLiq/7fL0glaKUysveYZd1rHMW9FHLvVXBU/d+qWApuA3i4lCFu85Lntal4rUPVSDUDeZm4nDwN4ysoVgrArd26rXLsMY9XrOr6w3kxt7gif7gn7kca9bkwAFECwnhDQut96EOaeTOGyAr0il8mrc4ZBq2lvw5LXwDYNiK2gJDXwAXIEiwkNbMO3fNz1StnJb12ZBgGUCPU3wTiS4qVjVE87qojmQC5RuwUOcRsXyf9HRafP4AdJSIwifQoDnPM53SpQA/YchSk75JTdu82VGFPmTeFIXUWC6BQFMDGfr75nV6CZ0l13mFrO5Q==

JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA | Fecha:2024-04-16 12:50:58 | FIRMANTE

GoKGYcB0DdzoZ+u1+8sbqDG45IM+EgcfW5O5q3dRnEUdKE6KdCz3E13yeL9WZGM1GsnP7kk0DLIkMxpWW7FoT/7l2u6CFU4T3b9yQXSkkrMYypDZJpvtKuFeNBqUdntS0AewDR0Gw7X3H0r3lw+C9BWDi2uGfhs8mSgf/Nz3SY2VPEWL8Cd2MMjLwd2m2diAmaLREc581tacxTWnEMUOmQpXtRta6he7zBKvIXy81SRkipkmFNPgm/Q7p6eqZP2D8JRiU+SgN3kXjbZ3L7tj43WRdOkcMHQT6wpA/kY7anYwdCWDScotqTj7r6m7E9nwVpcu67R5l4lcJqYk7HA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



CEeAsD6Tp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LigUNC37jtfqmV5W69MjBpvExYzH>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029