



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA:

Genotipificación de *Klebsiella pneumoniae* mediante el análisis de Secuencias de Locus Múltiples (MLST) en una colección de aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas de dos hospitales de referencia del Ecuador

AUTOR: ARÉVALO GRANDA, JOHANNA VALENTINA

DIRECTORA: JIMÉNEZ ARIAS, ANA PATRICIA, PhD.

SANGOLQUÍ

2018

CERTIFICACIÓN



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación "*GENOTIPIFICACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae* MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LOCUS MÚLTIPLES (MLST) EN UNA COLECCIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS PROVENIENTES DE INFECCIONES SISTÉMICAS DE DOS HOSPITALES DE REFERENCIA DEL ECUADOR*" realizado por la señorita *ARÉVALO GRANDA, JOHANNA VALENTINA* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas ESPE razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 06 de marzo de 2018

Ana Patricia Jiménez Arias, PhD.

DIRECTORA

CC. 1713475364

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **ARÉVALO GRANDA, JOHANNA VALENTINA**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: ***“GENOTIPIFICACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae* MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LOCUS MÚLTIPLES (MLST) EN UNA COLECCIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS PROVENIENTES DE INFECCIONES SISTÉMICAS DE DOS HOSPITALES DE REFERENCIA DEL ECUADOR”*** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación es veraz.

Sangolqui, 06 de marzo de 2018

Johanna Valentina Arévalo Granda

C.C. 1715849582

AUTORIZACIÓN



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

*Yo, ARÉVALO GRANDA, JOHANNA VALENTINA autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación "GENOTIPIFICACIÓN DE *Klebsiella pneumoniae* MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LOCUS MÚLTIPLES (MLST) EN UNA COLECCIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS PROVENIENTES DE INFECCIONES SISTÉMICAS DE DOS HOSPITALES DE REFERENCIA DEL ECUADOR" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

Sangolquí, 06 de marzo de 2018

Johanna Valentina Arévalo Granda

C.C. 1715849582

DEDICATORIA

A mi madre por tener la valentía y el coraje de forjar a mis hermanos y a mí, a ser personas luchadoras con corazones nobles.

A mis hermanos Tannhauser, Natalia y Eugenia y a mi abuelito Enrique, por saber aconsejarme y llenar de risas mis días de desvelo.

A Eduardo quien le devolvió la chispa y la motivación a mi vida y a mi corazón.

A mis mejores amigos David, Gabriela, Ariana, Alex y Jonathan pues con ellos aprendí lo que es la lealtad, la responsabilidad y el trabajo en equipo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a todo el cuerpo de docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología por formarme en esta ciencia, exigir el máximo de mí en cada uno de los niveles y guiarme hacia una vida en la investigación.

Al Hospital Carlos Andrade Marín y al Hospital de Especialidades Eugenio Espejo por brindarme los aislados clínicos con los que se realizó este trabajo de titulación.

A mis profesores Dr. Marcelo Grijalva y Dra. Patricia Jiménez por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus consejos y por permitirme desarrollar mis habilidades investigativas.

Agradezco muy especialmente a la magister María José Vallejo por guiarme desde el primer día que ingresé al laboratorio, por las largas conversaciones, por los momentos felices y tristes, por saber incentivar mi curiosidad y por ser mi amiga y mi guía.

A la Dra. Gabriela Jaramillo por la apertura en el Hospital de Especialidades Eugenio Espejo y el consejo en mis épocas de desmallo.

Al laboratorio National Reference Centre for Antibiotic Resistant Gram-Negative Bacilli en Mont-Godinne Bélgica por la confirmación de los patrones de resistencia de los aislados clínicos estudiados.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que estuvieron presentes durante el desarrollo de este trabajo de titulación, a Lizeth, Gabriela, Judith, Bryan, Tatiana, Katherine, Esteban, Valeria, William y Nayara.

Agradezco a la vida por enseñarme la diversidad de las personas y lo que puede llegar a ser el ser humano.

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
TABLA DE CONTENIDOS	viii
LISTADO DE FIGURAS	xi
LISTADO DE TABLAS	xii
LISTADO DE ANEXOS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos del trabajo de titulación	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.1.1. Taxonomía de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.1.2. Morfología de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.1.3. Epidemiología y evolución de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.1.4. Genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
2.1.5. Factores de Virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
2.1.5.1. Polisacáridos capsulares (CPs)	10
2.1.5.2. Lipopolisacáridos (LPS)	10
2.1.5.3. Pili o Fimbria	11
2.1.5.4. Sideróforos	11
2.1.6. Resistencia antimicrobiana	11

2.1.7.	Importancia clínica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
2.2.	Caracterización de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
2.2.1.	Métodos Fenotípicos de Tipificación	15
2.2.1.1.	Biotipificación	15
2.2.1.2.	Serotipificación o Tipificación de cápsula.....	15
2.2.1.3.	Tipificación de Fagos.....	16
2.2.1.4.	Tipificación de Bacteriocinas	16
2.2.2.	Métodos Moleculares de tipificación.....	16
2.2.2.1.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
2.2.2.2.	Electroforesis de Campo Pulsado	17
2.2.2.3.	Tipificación de Secuencias de Locus Múltiple (MLST).....	17
2.2.2.3.1.	Genes constitutivos o housekeeping de <i>Klebsiella pneumoniae</i> analizados a través de la técnica de MLST	18
2.3.	Secuenciación Sanger	19
2.4.	Mecanismos de evolución molecular.....	20
2.4.1.	Mutaciones.....	20
2.4.2.	Recombinación	21
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA		22
3.1.	Participantes.....	22
3.2.	Zona de estudio.....	22
3.3.	Periodo de tiempo de la investigación	23
3.4.	Procedimientos.....	23
3.4.1.	Colección y mantenimiento de aislados clínicos	23
3.4.1.1.	Recolección de aislados clínicos de hemocultivos con crecimiento del Hospital Carlos Andrade Marín y del Hospital Eugenio Espejo.....	23
3.4.1.2.	Parámetros de selección de aislados	24
3.4.1.3.	Mantenimiento de cultivos puros de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y criopreservación ...	24
3.4.1.4.	Cultivo de cepas de trabajo.....	24
3.4.2.	Extracción de ADN bacteriano	25
3.4.2.1.	Electroforesis en gel de agarosa.....	26
3.4.2.2.	Cuantificación de ADN bacteriano por Espectrofotometría.....	26
3.4.3.	Reacción en Cadena de la Polimerasa	27
3.4.3.1.	PCR convencional de genes constitutivos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> : <i>rpoB</i> , <i>gapA</i> , <i>mdh</i> , <i>infB</i> , <i>tonB</i> , <i>phoE</i> y <i>pgi</i>	27
3.4.3.2.	Electroforesis en gel de agarosa.....	31
3.4.3.3.	Purificación de Productos de PCR.....	31

3.4.4.	Secuenciación Sanger	32
3.4.4.1.	Secuenciación cíclica de genes constitutivos.....	32
3.4.4.2.	Purificación de productos de secuenciación cíclica.....	34
3.4.4.3.	Electroforesis capilar	34
3.5.	Análisis Bioinformático.....	35
3.5.1.	Curación de Secuencias	35
3.5.2.	Identificación de perfiles alélicos y Secuencias Tipo (ST).....	35
3.6.	Análisis de Datos	35
3.6.1.	Frecuencia de Números Alélicos y Frecuencia de Secuencias Tipo	35
3.7.	Análisis Filogenéticos.....	36
3.7.1.	Identificación de Complejos Clonales	36
3.7.2.	Construcción del Árbol de Mínima Expansión (MSTree).....	36
3.7.3.	Construcción del Árbol Filogenético.....	37
3.7.4.	Construcción de la red dividida (Split network).....	37
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....		38
4.1.	Colección y mantenimiento de aislados clínicos	38
4.2.	Amplificación de genes constitutivos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> : <i>rpoB</i> , <i>gapA</i> , <i>mdh</i> , <i>infB</i> , <i>tonB</i> , <i>phoE</i> y <i>pgi</i> ; mediante PCR convencional	39
4.3.	Análisis Bioinformático.....	42
4.3.1.	Identificación de números alélicos y secuencias tipo	43
4.4.	Análisis de Datos	45
4.4.1.	Frecuencia de Números Alélicos	45
4.4.2.	Frecuencia de Secuencias Tipo.....	46
4.5.	Análisis Filogenético	48
4.5.1.	Identificación de Complejos Clonales	48
4.5.2.	Árbol de la mínima expansión.....	49
4.5.3.	Construcción del Árbol Filogenético.....	50
4.5.4.	Construcción de la red dividida (Split network).....	52
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN		53
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES		63
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....		65
BIBLIOGRAFÍA.....		66
ANEXOS		

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Distribución epidemiológica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
Figura 2	Estructura de la membrana de <i>K. pneumoniae</i>	7
Figura 4	Distribución clonal de brotes de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
Figura 5	Factores de virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
Figura 6	Resistencia antimicrobiana.	13
Figura 7	Incidencia de las <i>Enterobacteriaceae</i> asociadas a bacteriemias.....	13
Figura 8	Infección de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a los epitelios alveolares.....	14
Figura 9	Secuenciación Sanger	20
Figura 10	Patrón de Resistencia de los aislados clínicos por hospital.	38
Figura 11	Aislados clínicos de pacientes con infecciones sistémicas producidas por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
Figura 12	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen <i>rpoB</i> (1076pb) de <i>K. pneumoniae</i> por PCR convencional.	40
Figura 13	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen <i>gapA</i> (663pb) de <i>K. pneumoniae</i> por PCR convencional..	40
Figura 14	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen <i>mdh</i> (757pb) de <i>K. pneumoniae</i> por PCR convencional. ...	40
Figura 15	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen <i>infB</i> (463pb) de <i>K. pneumoniae</i> por PCR convencional....	41
Figura 16	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen <i>tonB</i> (540pb) de <i>K. pneumoniae</i> por PCR convencional... ..	41
Figura 17	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen <i>phoE</i> (603pb) de <i>K. pneumoniae</i> por PCR convencional.. ..	41
Figura 18	Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen <i>pgi</i> (718pb) de <i>K. pneumoniae</i> por PCR convencional.	42
Figura 19	Frecuencias de los números alélicos.....	45
Figura 20	Frecuencias de Secuencias tipo.....	48
Figura 21	Agrupamiento clonal de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aislada de hemocultivos mediante eBURST.....	48
Figura 22	Árbol de mínima expansión de 64 aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes de hemocultivos. Software BioNumerics.....	50
Figura 23	Dendrograma generado a partir de la relación de los perfiles alélicos de 64 aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes de infecciones sistémicas. Método de máxima verosimilitud, MEGA7.....	51
Figura 24	Red dividida (Split network) generada a partir de la relación de las 28 secuencias tipo de los 64 aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes de infecciones sistémicas.	52

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	<i>Clasificación taxonómica de Klebsiella pneumoniae.</i>	6
Tabla 2	<i>Descripción del genoma de Klebsiella pneumoniae</i>	9
Tabla 3	<i>Primers utilizados para la amplificación de los genes constitutivos de Klebsiella pneumoniae: rpoB, gapA, mdh, infB, tonB, phoE, pgi.</i>	28
Tabla 4	<i>Componentes de la PCR para gapA, mdh, infB, tonB, phoE y pgi.</i>	29
Tabla 5	<i>Componentes de la PCR para rpoB.</i>	29
Tabla 6	<i>Programa de termociclado para la amplificación del gen rpoB.</i>	30
Tabla 7	<i>Programa de termociclado para la amplificación del gen gapA.</i>	30
Tabla 8	<i>Programa de termociclado para la amplificación del gen mdh.</i>	30
Tabla 9	<i>Programa de termociclado para la amplificación de los genes infB, tonB, phoE, pgi.</i>	30
Tabla 10	<i>Componentes de la secuenciación cíclica del control de cadena doble de ADN pGEMTM-3Zf(+).</i>	32
Tabla 11	<i>Componentes de la secuenciación cíclica de los productos de PCR de gapA, mdh, infB, tonB, phoE y pgi.</i>	33
Tabla 12	<i>Componentes de la secuenciación cíclica de los productos de PCR de rpoB</i>	33
Tabla 13	<i>Programa de termociclado para la secuenciación cíclica de gapA, mdh, infB, tonB, phoE y pgi</i>	33
Tabla 14	<i>Programa de termociclado para la secuenciación cíclica de rpoB.</i>	34
Tabla 15	<i>Patrón de resistencia de los aislados clínicos con sus correspondientes porcentajes.</i>	38
Tabla 16	<i>Perfiles alélicos correspondientes a los 64 aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas.</i>	43
Tabla 17	<i>Frecuencias de números alélicos</i>	46
Tabla 18	<i>Frecuencias de las Secuencias Tipo</i>	47

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1 Determinación de los tamaños de los fragmentos de los genes constitutivos mediante el uso del programa Primer-BLAST

ANEXO 2 Cantidades y volúmenes recomendados para la Secuenciación cíclica con BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)

ANEXO 3 Control de la Secuenciación cíclica pGEM™-3Zf(+)

ANEXO 4 Estándar de secuenciación BidDye® Terminator v3.1/ Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems)

ANEXO 5 Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de la amplificación de los fragmentos de los genes constitutivos de *Klebsiella pneumoniae* por PCR convencional

ANEXO 6 Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de la purificación de fragmentos de PCR de los genes constitutivos de *Klebsiella pneumoniae*

ANEXO 7 Resultados de la electroforesis capilar

LISTADO DE ABREVIATURAS

%GC	Porcentaje de guanina citosina
°C	Grados centígrados
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
API	Índice Analítico de Perfil (siglas en inglés)
AST	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana (siglas en inglés)
BHI	Infusión corazón cerebro (siglas en inglés)
BIGSdb	Base de datos de secuencias genómicas de aislados bacterianos (siglas en inglés)
BLEE	Beta Lactamasa de Espectro Extendido
C	Citosina
CC	Complejo Clonal
GC	Grupo Clonal
Chr	Cromosoma
CPs	Polisacáridos capsulares
CRE	Enterobacteria Resistente a Carbapenémicos
ddNTPs	Dideoxinucleótido trifosfato
dNTPs	Deoxinucleótido trifosfato
eBURST	Basado en la secuencia tipo relacionada (siglas en inglés)
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno (siglas en inglés)
G	Guanina
<i>gapA</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HCAM	Hospital Carlos Andrade Marín
HCl	Ácido Clorhídrico
HEE	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo
<i>infB</i>	Factor beta de iniciación de la transcripción
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
Kb	Kilo bases
kbp	Kilo pares de bases
kDa	Kilo Dalton
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de Carbapenemasa
LPS	Lipopolisacáridos
Mbp	Mega pares de bases
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro
MLST	Tipificación de Secuencias de Locus Múltiple
MLT	Árbol de máxima verosimilitud (siglas en inglés)

MLVA	Locus Múltiple - Número Variable de Repeticiones en Tándem
mM	Milimolar
Mpb	Mega pares de bases
MSTree	Árbol de Mínima Expansión
NDM	Nueva Delhi metalo beta lactamasa
ng/μL	Nanogramo por microlitro
nm	Nanómetro
OTU	Unidad Operativa Taxonómica
OXA	Oxacilinasas
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en Gel de Campo Pulsado
<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa
<i>phoE</i>	Fosforina E
Plsm	Plásmido
pmol/μL	Picomol por microlitro
primer F	Cebador forward o directo
primer R	Cebador reverso
R	Adenina o Guanina
rpm	revoluciones por minuto
<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la RNA polimerasa
s	Segundos
SN	Red dividida (siglas en inglés)
ST	Secuencia tipo
STNA	Secuencia tipo no disponible
T	Timina
TBE	Tris borato de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
<i>tonB</i>	Traductor de la energía periplásmica
TSA	Agar Triptosa de Soya
U/μL	Unidades por microlitro
V	Voltios
v/w	Porcentaje volumen peso
VNTR	Número Variable de Repeticiones en Tándem
W	Adenina o Timina
μm	Micrómetro
μM	Micro molar

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es una enterobacteria de importancia mundial en el ámbito de la salud debido a su rápida adquisición de resistencia a antimicrobianos, dicha cualidad junto con los mecanismos de transmisión de infecciones, pueden ser estudiados mediante herramientas de análisis de la variabilidad genética, que permiten conocer las relaciones evolutivas entre patógenos causantes de brotes en hospitales y en la comunidad y también establecer mecanismos de contención de infecciones. En el presente estudio, 64 aislados clínicos procedentes de infecciones sistémicas reportadas en dos hospitales de referencia del Ecuador, Hospital Carlos Andrade Marín y Hospital de Especialidades Eugenio Espejo fueron tipificados mediante la técnica MLST (Multi-Locus-Sequence-Typing). Se estandarizaron y se optimizaron ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) de 7 genes constitutivos *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi* de *K. pneumoniae*. Los productos de PCR fueron secuenciados y una vez curadas las secuencias, fueron comparadas contra una base de datos de referencia (Instituto Pasteur) para obtener el perfil alélico y su correspondiente secuencia tipo. Mediante análisis bioinformáticos se identificaron complejos y grupos clonales, se construyeron árboles de mínima expansión, árboles filogenéticos y redes divididas. Se encontraron 28 secuencias tipo, 25 previamente reportadas y 3 no reportadas; agrupadas en 2 complejos clonales, 3 grupos clonales y 15 singletons. Al compararlas frente al árbol filogenético y red dividida, se obtuvieron 2 complejos clonales y 1 grupo clonal. El análisis genotipo-fenotipo permitió determinar que, CC2 y GC3 correspondían a aislados susceptibles, ST15 correspondió a un patrón BLEE y ST258 a un patrón CRE. Se concluye que en los hospitales no se evidencia brotes, sino infecciones individuales.

PALABRAS CLAVE:

- **TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE LOCUS MÚLTIPLES**
- *Klebsiella pneumoniae*
- **RESISTENCIA BACTERIANA**
- **GENOTIPO VS FENOTIPO**

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a health global importance Enterobacteria due to the fast resistance acquirement. This characteristic and transmission mechanisms of infections can be studied through analysis tools of genetic variability of this pathogen. That allows to know the evolutionary relationships between pathogens causing outbreaks in hospitals and community and establish infection containment mechanisms. In this study, 64 bloodstream clinical isolates were obtained from two reference hospitals, Carlos Andrade Marín Hospital and Eugenio Espejo Hospital. After DNA isolation, 7 genes Multilocus Sequence Typing system (MLST) was performed on the genetic material. Polymerase Chain Reaction (PCR) assays, corresponding to seven *Klebsiella pneumoniae* housekeeping genes, *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* and *pgi* were optimized and standardized. PCR products were then sequenced and once chromatograms were cured, they were compared to Bacterial Isolate Genome Sequence Database (BIGSdb), Pasteur Institute, with the purpose of getting corresponding allelic profile and type sequences. The obtained results identified groups and clonal complexes. Minimum spanning trees, phylogenetic trees and split networks were then built with the aid of bioinformatics software. Twenty-eight sequence types were identified. Twenty-five sequence types were already reported while the remaining three were non-reported. Sequence types were later clustered showing 2 clonal complexes, 3 clonal groups and 15 singletons. When phylogenetic trees and split networks were used, 2 clonal complexes and 1 clonal group were found. The genotype phenotype analysis allowed to identify that the isolates within CC2 and GC3 were susceptible, ST15 corresponded to an ESBL and ST258 to CRE pattern. With this information, it is possible to affirm that hospitals do not show outbreaks, instead they have individual infections.

KEY WORDS:

- **MULTILOCUS SEQUENCE TYPING**
- *Klebsiella pneumoniae*
- **BACTERIUM RESISTANCE**
- **GENOTYPE VS PHENOTYPE**

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Klebsiella pneumoniae es un microorganismo ubicuo que fue identificado por primera vez por Edwing Klebs en 1875 en exudados bronquiales. Se identificó que presenta un patrón intrínseco a ampicilina y carbenicilina, sin embargo, a partir de 1970 debido a prolongadas estancias intrahospitalarias, técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas, el uso inadecuado de antimicrobianos, intervenciones quirúrgicas y manipulación de varios pacientes, su susceptibilidad empezó a disminuir pues se volvieron aminoglucósidos resistentes (Puerta & Mateos, 2010). Después de una década, presentaron enzimas hidrolíticas de β -lactamasas de amplio espectro y actualmente puede observarse que *K. pneumoniae* tiene resistencia a carbapenémicos, antibióticos de mayor espectro y resistencia a β -lactamasas (Podschun & Ullmann, 1998). Mencionada evolución es causada por la incorporación de genes al genoma núcleo y principalmente por la transferencia directa de plásmidos entre *Klebsiella* y otras Enterobacterias (Wyres & Holt, 2016).

Debido a la emergente aparición de *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos, técnicas como la secuenciación han sido útiles para la investigación de: los genes asociados a la resistencia, la variación genética, la diversidad poblacional patógena, la evolución clínica y los patrones de diseminación (Wyres & Holt, 2016). En estudios preliminares, realizados en el Laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología, se optimizó un análisis de PCR convencional para la amplificación de los genes constitutivos y se determinaron relaciones clonales en *Klebsiella pneumoniae* por MLST identificándose 24 secuencias tipo diferentes agrupados en cuatro grupos clonales, se demostró también que las poblaciones tienden a ajustar su variabilidad eliminando alelos poco

frecuentes (Balarezo, 2014). Sin embargo, los estudios en *Klebsiella pneumoniae* no han prosperado en nuestro país por lo que las ideas de la epidemiología de este microorganismo, su evolución y su tratamiento continúan difusas, por lo que se pretende investigar la relación que presenta los genes constitutivos de este microorganismo con la resistencia antimicrobiana.

1.2. Justificación

Dentro de la familia de las Enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae* es el microorganismo más comúnmente aislado como fuente de infección, es decir, es un patógeno oportunista causante del 4-8% de las infecciones nosocomiales asociadas a largas estancias hospitalarias, enfermedades base, inadecuada terapia antibiótica y falta de medidas de control en los pacientes infectados (Córdova et al., 2012). En la última década, se ha incrementado las infecciones por bacilos Gram negativos productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), por lo que las bacterias han llegado a ser altamente resistentes incluso a carbapenémicos (CRE), antibióticos de último recurso para las infecciones bacterianas que amenazan la vida (Martin et al., 2016). El retraso en la evolución de medicamentos contra CREs ha ocasionado que los pacientes sean tratados de forma empírica, lo que conduce a mayores tasas de mortalidad y resistencia antimicrobiana (Durdu et al., 2016).

La tipificación de *Klebsiella* se ha llevado a cabo por métodos fenotípicos como la biotipificación, tipificación de fagos, serotipificación y tipificación de bacteriocinas; y por métodos moleculares como la amplificación de ADN, ribotipificación, perfiles plasmídicos, análisis de enzimas multilocus, electroforesis de campo pulsado y secuenciación. A excepción de la electroforesis en campo pulsado y la secuenciación, estos métodos presentan limitaciones prácticas

1.3. Objetivos del trabajo de titulación

1.3.1. Objetivo General

- Genotipificar *Klebsiella pneumoniae* mediante análisis de Secuencias de Locus Múltiples (MLST) en una colección de aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas de dos hospitales de referencia del Ecuador.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Optimizar el sistema de MLST y tipificar *Klebsiella pneumoniae* a partir de aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) y del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo (HEE).
- Establecer, mediante herramientas bioinformáticas, relaciones clonales entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* obtenidas de los aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas del HCAM y del HEE.
- Analizar una posible relación entre los perfiles de MLST y los perfiles AST (antibiograma) y genotípicos en los aislados en estudio.

CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gam negativa perteneciente a la familia de las Enterobacterias; su distribución es ubícuota pues se encuentra en el suelo, en el agua, en las plantas e incluso en el cuerpo humano donde coloniza principalmente el sistema respiratorio, genitourinario, digestivo y sanguíneo. Es un microorganismo aerobio o anaerobio facultativo, no formador de esporas e inmóvil. Fermentan la glucosa y la lactosa a ácido, con o sin producción de gas (Puerta & Mateos, 2010). Clínicamente, *K. pneumoniae* es considerada una de las 6 bacterias patógenas oportunistas más importantes, pues es la causante del 4-8% de las infecciones nosocomiales en el tracto urinario, digestivo, respiratorio e infecciones en tejidos blandos. Además, este microorganismo presenta resistencia a la mayoría de fármacos (Córdova et al., 2012).

2.1.1. Taxonomía de *Klebsiella pneumoniae*

Actualmente, el género *Klebsiella* se pueden clasificar de acuerdo a tres diferentes sistemas taxonómicos: Cowan, Bascomb y Orskov. Gran Bretaña sigue el sistema Cowan mientras que Europa y Estados Unidos utilizan el sistema Orskov donde *Klebsiella pneumoniae* presenta tres subespecies: *pneumoniae*, *ozaenae* y *rhinoscleromatis* cuyo genoma varía en un 0,5%, aproximadamente (Podschun & Ullmann, 1998). La clasificación taxonómica de *Klebsiella* se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Klebsiella pneumoniae.

Reino	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Enterobacterales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Subespecies	<i>subsp. pneumoniae, subsp. ozaenae, subsp. rhinoscleromatis</i>

Fuente: (Podschun & Ullmann, 1998)

2.1.2. Morfología de *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae presenta forma de bacilo de 0,6-6µm de largo y 0,3-1µm de diámetro. Presenta una membrana interna constituida de una doble capa fosfolipídica seguida de una capa delgada de peptidoglucano y espacio periplásmico donde se concentran proteínas y finalmente una membrana externa que consiste en otra doble capa fosfolipídica de la cual sobresalen lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas y fimbrias (Figura 2) (Puerta & Mateos, 2010). En *Klebsiella* se pueden identificar 9 antígenos de LPS o antígenos O y 77 antígenos de polisacárido capsular o antígenos K. Las colonias son grandes, con superficie lisa, elevación convexa, forma irregular o redonda, bordes ondulados, consistencia mucoide debido a su cápsula de polisacárido y aspecto acuoso, brillante. En medio de cultivo Agar McConkey y Agar eosina azul de metileno (EMB) son de color rosado siendo de 30-37°C su temperatura óptima de crecimiento (Pérez & Mota, 2008).

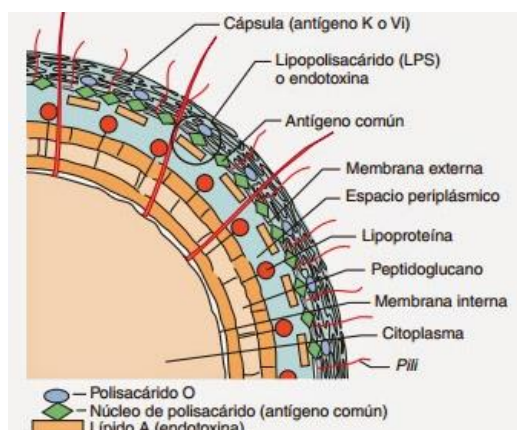


Figura 2 Estructura de la membrana de *K. pneumoniae*
Fuente: (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016)

2.1.3. Epidemiología y evolución de *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es un microorganismo presente en el ambiente, siendo el ámbito hospitalario el que presenta elevadas tasas de colonización. El uso de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas, como son el uso de catéteres intravenosos, endoscopias o intervenciones quirúrgicas; las largas estancias intrahospitalarias, el empleo de inmunosupresores y de antibióticos de amplio espectro son factores que intervienen en la diseminación y resistencia antimicrobiana. *K. pneumoniae* es la causante del 4-8% de las infecciones hospitalarias y el 3% de los brotes epidémicos (Córdova et al., 2012).

Este microorganismo fue observado por primera vez en exudados bronquiales por el microbiólogo alemán Edwing Klebs en 1875. En 1882, Friedländer identificó que se trataba de un bacilo y en 1887, Trevisan lo llamó *Klebsiella pneumoniae*. Para 1970 las cepas se volvieron resistentes a aminoglucósidos, en 1982 producían BLEE confiriendo resistencia a cefalosporinas de espectro extendido, siendo la causante del 14% al 16% de las infecciones en Europa, y desde 1995 se ha visto resistencia a carbapenémicos disminuyendo las posibilidades terapéuticas (Podschun & Ullmann, 1998). Actualmente, *K. pneumoniae* presenta 5 grupos clonales (CG, por

sus siglas en inglés) que se encuentran relacionados con la resistencia a antimicrobianos: CG258, CG14/15, CG17/20, CG43, CG147 (Figura 3) dentro de los cuales se distribuyen una vasta cantidad de secuencias tipo (ST). CG258 se distingue del resto de CG pues sufrió un evento de recombinación de 1,3Mbp en 1985 volviéndolo resistente a carbapenemasas; incluye predominantemente a ST258, ST11 y en menor grado a ST340, ST512, ST437, ST833, ST855 y ST1199. CG14/15 se caracteriza por presentar cuatro plásmidos de 69kbp a 305kbp que le confieren genes resistentes a BLEE, carbapenemasas y colistina; incluye a ST14 y ST15. Los CG restantes fueron descubiertos a inicios del año 2000. CG17/20 incluye a ST16 y ST17; CG43 a ST101 y CG147 a ST147 (Wyres & Holt, 2016).

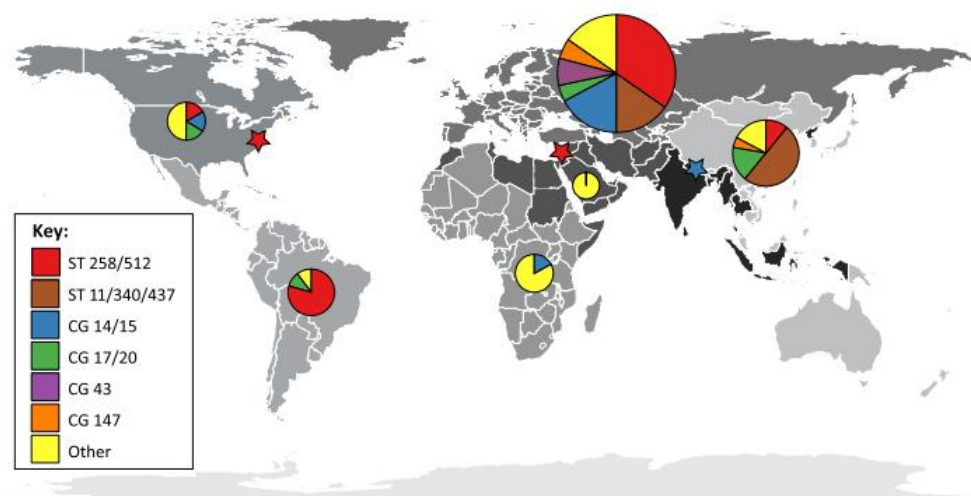


Figura 3 Distribución clonal de brotes de *Klebsiella pneumoniae*
Fuente: (Wyres & Holt, 2016)

2.1.4. Genoma de *Klebsiella pneumoniae*

El genoma total de *K. pneumoniae* mide 5,69Mpb, codifica aproximadamente 5500 genes de los cuales 2000 conforman el genoma núcleo, común en todas las *Klebsiella*, y 3500 codifican genes accesorios que permiten a las bacterias tener funciones de metabolismo de carbohidratos

(19%), otras vías metabólicas (18%), transportadores de membrana (13%), cápsula de exopolisacáridos (11%), resistencia y metabolismo del hierro (2%), resistencia a antibióticos (1%) y funciones desconocidas (36%) (Wyres & Holt, 2016). El genoma incluye un solo cromosoma circular de 5,3Mpb con un contenido de G-C del 57,5%; presenta además 6 plásmidos pKPHS1, pKPHS2, pKPHS3, pKPHS4, pKPHS5 Y pKPHS6 (Tabla 2). Lo que indica que *K. pneumoniae* presenta un genoma “open pan genome”, es decir que puede soportar un número ilimitado de genes accesorios (Liu et al., 2012).

Tabla 2

Descripción del genoma de Klebsiella pneumoniae.

Tipo	Nombre	Número de Acceso en GeneBank	Tamaño (Mpb)	GC%	Genes
Chr	---	CP003200.1	5,332	57,5	5404
Plsm	pKPHS1	CP003223.1	0,122	49,5	141
Plsm	pKPHS2	CP003224.1	0,111	53,3	160
Plsm	pKPHS3	CP003225.1	0,105	52,5	152
Plsm	pKPHS4	CP003226.1	0,003	52,2	4
Plsm	pKPHS5	CP003227.1	0,003	42,8	5
Plsm	pKPHS6	CP003228.1	0,001	47,9	1

Fuente:(Liu et al., 2012)

2.1.5. Factores de Virulencia de *Klebsiella pneumoniae*

Los factores de virulencia son un conjunto de condiciones de *K. pneumoniae* que impide que el sistema inmunitario del hospedero pueda eliminarlo. Se presentan en forma diferente si se trata de una infección comunitaria o si se trata de una infección nosocomial (Podschn & Ullmann, 1998). Entre los factores de virulencia de esta bacteria se encuentran los polisacáridos capsulares (CPs), pilis o fimbrias, lipopolisacáridos (LPS) y sideróforos (Figura 4).

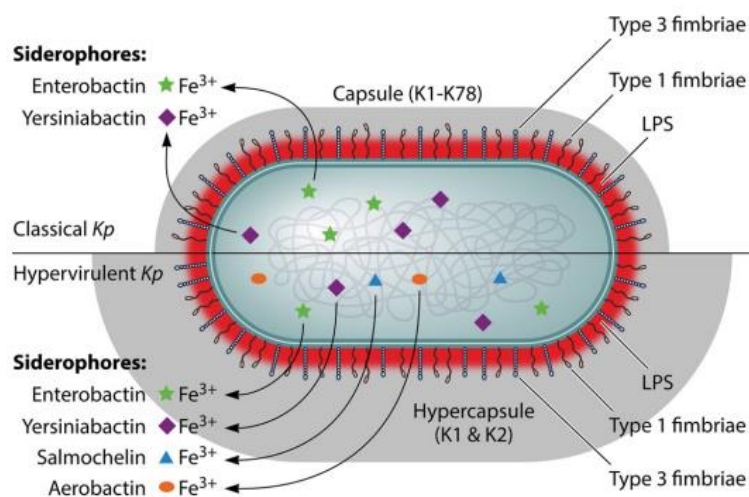


Figura 4 Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*
Fuente: (Paczosa & Meccas, 2016)

2.1.5.1. Polisacáridos capsulares (CPs)

La cápsula bacteriana es el factor de mayor virulencia pues se encuentra cerca de 77 serotipos o antígenos K diferentes en *Klebsiella pneumoniae*, es sintetizada por la vía dependiente de polimerización de Wzy, requiere entre 16-25 genes para su síntesis total. La cápsula protege a la bacteria de la opsonización y fagocitosis (Li, Zhao, Liu, Chen, & Zhou, 2014; Podschun & Ullmann, 1998).

2.1.5.2. Lipopolisacáridos (LPS)

Los LPS están formados por tres partes: el lípido A, anclado en la membrana externa, el polisacárido central y el antígeno O en la parte más externa. Se han identificado 9 antígenos O que protegen a la bacteria de la muerte mediana por el complemento e incrementan el riesgo de una bacteriemia. Existen dos tipos de polisacáridos centrales, el tipo 1 y el tipo 2 diferenciados únicamente por dos de los genes a partir de los cuales son sintetizados. El lípido A es sintetizado

en el citoplasma y transportado y anclado en la membrana externa de la bacteria; da resistencia frente a la inmunidad innata del hospedero (Li et al., 2014; Podschun & Ullmann, 1998).

2.1.5.3. Pili o Fimbria

Las Fimbria son proyecciones filamentosas no flagelares ubicadas en la superficie bacteriana. Existen 4 tipos de fimbrias. Las fimbria tipo 1 son delgadas, rígidas y se encuentran en la superficie de la membrana externa, media la adhesión de la bacteria a estructuras que contienen manosa en el huésped. Las fimbria tipo 3 son de 2-4nm de ancho y de 0,5-2µm de largo, tiene la capacidad de unirse a moléculas de colágeno del hospedero y es la mayor contribuyente en la formación de biofilms. Las fimbria Kpc son sintetizadas y ensambladas por el operón *kpcABCD* asociado al a hipermucoviscosidad. Las fimbria KPF-28 adhesina son las más largas y flexibles; son un polímero de 28kDa que permiten la adhesión de las bacterias a líneas celulares humanas Caco-2 presentes en el intestino (Li et al., 2014; Podschun & Ullmann, 1998).

2.1.5.4. Sideróforos

Los sideróforos son moléculas transportadoras de hierro, elemento esencial para el crecimiento de las bacterias. La excreta de estas moléculas permite que el patógeno sobreviva y evada el mecanismo de inmunidad innata del hospedero (Li et al., 2014; Podschun & Ullmann, 1998).

2.1.6. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana se debe a la presencia de ciertos genes en el genoma núcleo y principalmente a la transferencia directa de plásmidos entre las *K. pneumoniae* y otras

Enterobacterias (Wyres & Holt, 2016). *K. pneumoniae* tienen resistencia natural a ampicilina y a carbenicilina. Sin embargo, actualmente se han vuelto resistente a cefalosporinas, aminoglucósidos, betalactamasas y carbapenemasas (Puerta & Mateos, 2010), presentando genes KPC, OXA-48 o NDM-1 que son de preocupación clínica pues se difunden no solo a nivel nosocomial sino también en la comunidad. La multirresistencia de *K. pneumoniae* va ligada directamente a la alta estabilidad de los plásmidos adquiridos y a más de 100 genes reguladores.

La transferencia horizontal de genes sea por conjugación, transformación o transducción (Figura 5A) permite que las bacterias adquieran resistencia debido al traspaso de información genética (Moreno, González, & Beltrán, 2009). Los mecanismos de resistencia antimicrobiana (Figura 5B) incluyen:

- Síntesis de enzimas hidrolíticas que destruyen a los antimicrobianos, por ejemplo, las β -lactamasas.
- Modificación del sitio activo, disminuye la afinidad entre bacteria y el antibiótico.
- Disminución de cantidad y de tamaño de las porinas en la pared celular.
- Transporte del antimicrobiano al espacio extracelular por bombas de eflujo.
- Desarrollo de vías alteradas del metabolismo cuando el antibiótico impide la síntesis de un elemento esencial.
- Mutación espontánea en genes cromosómicos de susceptibilidad antimicrobiana.

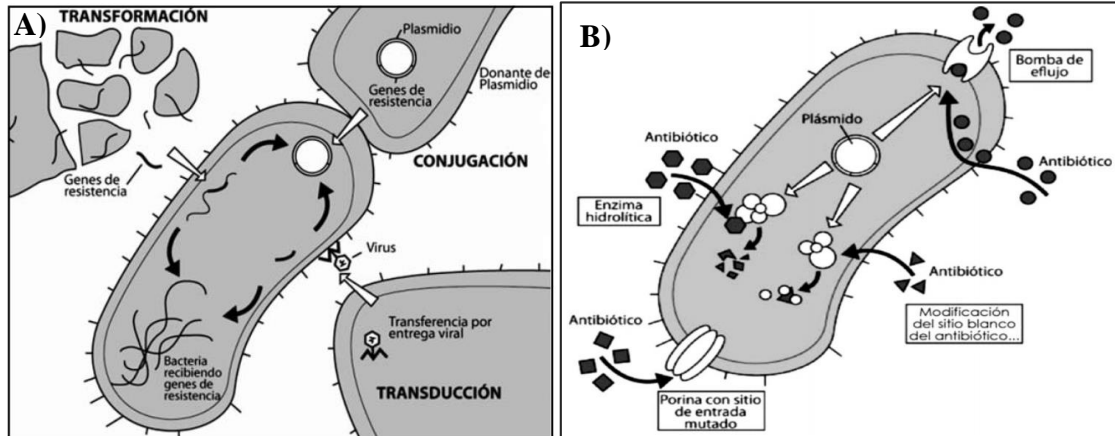


Figura 5 Resistencia antimicrobiana **A)** Transferencia horizontal de genes **B)** Mecanismos.
Fuente:(Guevara, 2015; Moreno et al., 2009)

2.1.7. Importancia clínica de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae está principalmente asociada a las infecciones de tracto urinario, digestivo, neumonía de carácter necrotizante así como al rinoscleroma en pacientes diabéticos, alcohólicos o inmunodeprimidos (Puerta & Mateos, 2010). Es el segundo patógeno, tras *Escherichia coli*, que causa bacteriemia pues presenta plásmidos que codifican la proteína aerobactina que promueve el crecimiento de las bacterias en la sangre debido a que toma el hierro de la transferina humana (Figura 6).

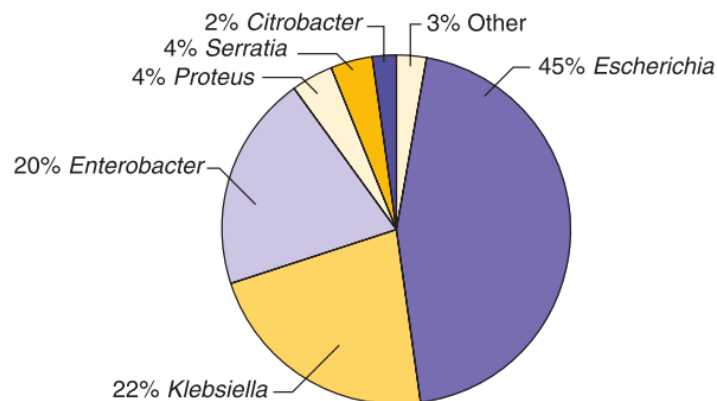


Figura 6 Incidencia de las *Enterobacteriaceae* asociadas a bacteriemias.
Fuente:(Murray et al., 2016)

En pacientes con neumonía, *K. pneumoniae* no virulenta es identificada en primer lugar por las células del epitelio alveolar, las cuales la invaginan e inician un mecanismo de eliminación a través de macrófagos y neutrófilos, sin embargo, cuando estas células no reconocen al microorganismo (en cepas virulentas), las bacterias quedan libres y hacen uso de las uniones celulares, que se encuentran ensanchadas y abiertas a causa de la inflamación del tejido en pacientes inmunodeprimidos, para acceder al endotelio y a continuación al torrente sanguíneo (Figura 7) (Albertí, 2004). La bacteria además puede causar destrucción necrótica de espacios alveolares, formación de cavidades, producción de esputo con sangre y fiebre (Murray et al., 2016).

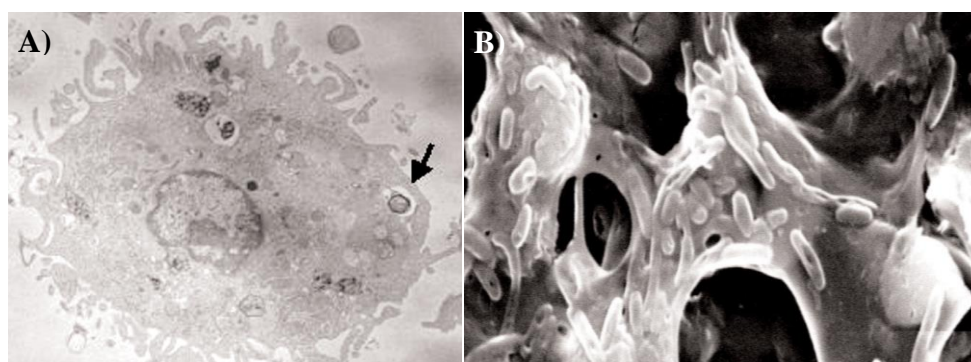


Figura 7 Infección de *Klebsiella pneumoniae* a los epitelios alveolares **A)** Cepa no virulenta fagocitada por un macrófago alveolar **B)** Cepas virulentas situadas en los espacios libres de los alveolos.

Fuente: (Albertí, 2004)

Las infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* llegan a ser crónicas debido a que los biofilms, formados en el paciente, protege al patógeno de la respuesta inmunitaria y de los antibióticos; y a que las bacterias adquieren multirresistencia haciendo difícil la elección de un tratamiento apropiado (Li et al., 2014). El grado de mucosidad en las cepas esta correlacionado con la capacidad de la cepa en establecer infecciones, es decir, determina su virulencia. En este sentido, las cepas hipervirulentas pueden colonizar pacientes sanos y generar abscesos en el hígado,

meningitis, fascitis necrotizante, endoftalmitis o neumonía. La mortalidad puede alcanzar el 90% de los pacientes no tratados y del 23-69% de los pacientes tratados (Martin et al., 2016).

2.2. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae*

2.2.1. Métodos Fenotípicos de Tipificación

La tipificación de *Klebsiella* permite mejorar el manejo de los brotes endémicos y epidémicos. Los métodos de tipificación, desde el menos específico al más específico, incluyen a la biotipificación, serotipificación, tipificación de fagos y tipificación de bacteriocinas (Podschun & Ullmann, 1998).

2.2.1.1. Biotipificación

Se basa en la determinación del microorganismo en base a reacciones bioquímicas y pruebas en medios de cultivo. Puede llevarse a cabo utilizando sistemas como el API 20E, pero debido a sus prolongados tiempos de cultivo no puede ser utilizado como herramienta epidemiológica (Podschun & Ullmann, 1998).

2.2.1.2. Serotipificación o Tipificación de cápsula

Se basa en la clasificación de los microorganismos con respecto a los antígenos que *Klebsiella* presenta en su cápsula de polisacáridos. Este género presenta 77 tipos diferentes de cápsulas descritos por 82 antígenos, sin embargo, el inconveniente es que para determinar específicamente al microorganismo se necesitan un gran número de reacciones serológicas. Además, este método requiere tiempo y es susceptible de interpretaciones (Podschun & Ullmann, 1998).

2.2.1.3. Tipificación de Fagos

Esta técnica fue desarrollada en 1960. Es usada únicamente como un método secundario debido a que su tasa de tipificación es apenas del 16% al 67% (Podschun & Ullmann, 1998).

2.2.1.4. Tipificación de Bacteriocinas

Las Bacteriocinas son proteínas producidas por una bacteria para impedir el crecimiento de bacterias de otras especies. Con esta técnica, el microorganismo puede caracterizarse por la capacidad para inhibir a las cepas indicadoras específicas o por la sensibilidad a la síntesis de bacteriocinas (Podschun & Ullmann, 1998).

2.2.2. Métodos Moleculares de tipificación

Los métodos moleculares de tipificación incluyen a perfiles plasmídicos, ribotipificación, análisis de enzimas de locus múltiple, reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis de campo pulsado y secuenciación. Estos métodos pretenden comparar los ácidos nucleicos entre varias cepas y establecer su relación epidemiológica.

2.2.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1985, es una técnica *in vitro* rápida que involucra la amplificación enzimática de fragmentos de ADN flanqueados entre dos secuencias de nucleótidos, cebadores o primer (Surzycki, 2000). Es una técnica utilizada en el campo microbiológico pues permite identificar genes asociados a bacterias y a su resistencia (Satán & Tamayo, 2016).

2.2.2.2. Electroforesis de Campo Pulsado

Consiste en el análisis macro de enzimas de restricción que reconocen sitios específicos del ADN bacteriano, generando fragmentos de elevado peso molecular que al migrar en geles de agarosa mediada por impulsos eléctricos constantes o no generan patrones discriminatorios entre patógenos (Satán & Tamayo, 2016).

2.2.2.3. Tipificación de Secuencias de Locus Múltiple (MLST)

La tipificación de secuencias de locus múltiple (MLST) fue establecida en el 2005, en esta técnica se decodifica de 7 a 9 genes constitutivos o “*housekeeping*” de las bacterias; permite realizar investigación sobre los linajes de las cepas, determinar su perfil alélico, sus patrones de diseminación y mejorar las estrategias de control de salud pública (Wyres & Holt, 2016) pues permite relacionar los resultados obtenidos con bases de datos en internet y generar una visión de la distribución mundial del microorganismo. El desarrollo de esta técnica fue posible gracias a los avances en la microbiología molecular orientada al conocimiento de la biología población y evolución bacteriana, a las secuencias de nucleótidos de alto rendimiento y a las bases de datos del internet (Perez, Porter, Viscidi, & Crandall, 2011). Esta técnica examina variaciones internas en los nucleótidos de genes que codifican proteínas con funciones metabólicas principales, por ello es necesario que se encuentre una sola copia del gen en todo el genoma. La secuencia nucleotídica de cada gen, generada a partir de la secuenciación Sanger, se encuentra entre los 400-600pb. Los alelos son designados cuando existen variaciones en la secuencia de un gen que en conjunto de los 7 genes permiten identificar el perfil alélico o secuencia tipo específica para cada muestra. Al escoger los 7 loci se debe tener en cuenta que los genes deben estar distribuidos a lo largo de todo

el genoma de manera que se evite zonas propensas a recombinación y mutación. Los genes escogidos no deben tampoco estar limitados por zonas codificantes que sufran de presión selectiva.

Existen dos estrategias para el análisis de los datos:

- **Método basado en los alelos:** designación de alelos y secuencias tipo para estimar la relación entre aislados y por lo tanto ignora el número de diferencias nucleotídicas entre alelos.
- **Método basado en los nucleótidos:** Secuenciación de nucleótidos para estimar las relaciones y los parámetros de población.

2.2.2.3.1. Genes constitutivos o *housekeeping* de *Klebsiella pneumoniae* analizados a través de la técnica de MLST

Los 7 genes tomados en cuenta para el análisis de *Klebsiella pneumoniae* son (Balarezo, 2014; Diancourt et al., 2005):

- ***rpoB*:** codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa B, enzima que reconoce sitios específicos de la región del promotor y transcribe ADN a ARN.
- ***gapA*:** codifica la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa que cataliza la oxidación de D-gliceraldehído 3 fosfato a 1, 3 difosfoglicerato.
- ***mdh*:** codifica la enzima malato deshidrogenasa que convierte el malato en oxalacetato.
- ***tonB*:** codifica la proteína de transducción de energía periplásmica encargada de activar el transporte de nutrientes a través de la membrana externa.
- ***infB*:** codifica el factor II de iniciación de la traducción IF-2, conocido también como complejo de iniciación ribosomal.

- ***phoE***: codifica la proteína de poro (porina) de la membrana externa fosforina E, que permite el transporte de fosfatos requeridos para la síntesis de nucleótidos y el metabolismo de la glucosa.
- ***pgi***: codifica la enzima glucosa 6 fosfato isomerasa que cataliza la isomerización de glucosa 6 fosfato en fructosa 6 fosfato.

2.3. Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger también conocida como secuenciación por terminación de cadena o secuenciación de dideoxi fue inventada en los años 70s por Friedrich Sanger y mejorada con el pasar del tiempo. Es el gold standard para la determinación de una secuencia nucleotídica debido a que es muy precisa, comparada con la NGS, y permite un sinnúmero de aplicaciones como la secuenciación de genes individualmente, la verificación de mutaciones, inserciones o deleciones, en algunos casos análisis de fragmentos largos, proyectos de pequeña escala que no incluyan muchos genes a analizar. Se basa en la detección de bases nitrogenadas marcadas con dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) fluorescentes que se incorporan en el ADN a través de una ADN polimerasa durante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), lo que permita determinar la base exacta en cada posición logrando obtener una lectura de la secuencia nucleotídica (GATC Biotech, 2018).

Los ddNTPs no cuentan con el grupo hidroxilo en el carbono 3 de la desoxirribosa del ADN, lo que impide la formación de enlaces fosfodiéster y evita la progresión de la síntesis de la cadena complementaria de ADN a partir del lugar en donde el ddNTP haya sido incorporado. Resulta entonces, fragmentos de ADN de diferentes tamaños que, tras migrar por un capilar relleno de un polímero, por acción de la electroforesis, son separadas de acuerdo a su tamaño y detectados

por un láser. El conjunto de señales fluorescentes emitidas por cada marcador excitado genera un cromatograma el cual detalla cada nucleótido en la cadena molde de ADN (Figura 8) (Applied Biosystems, 2009).

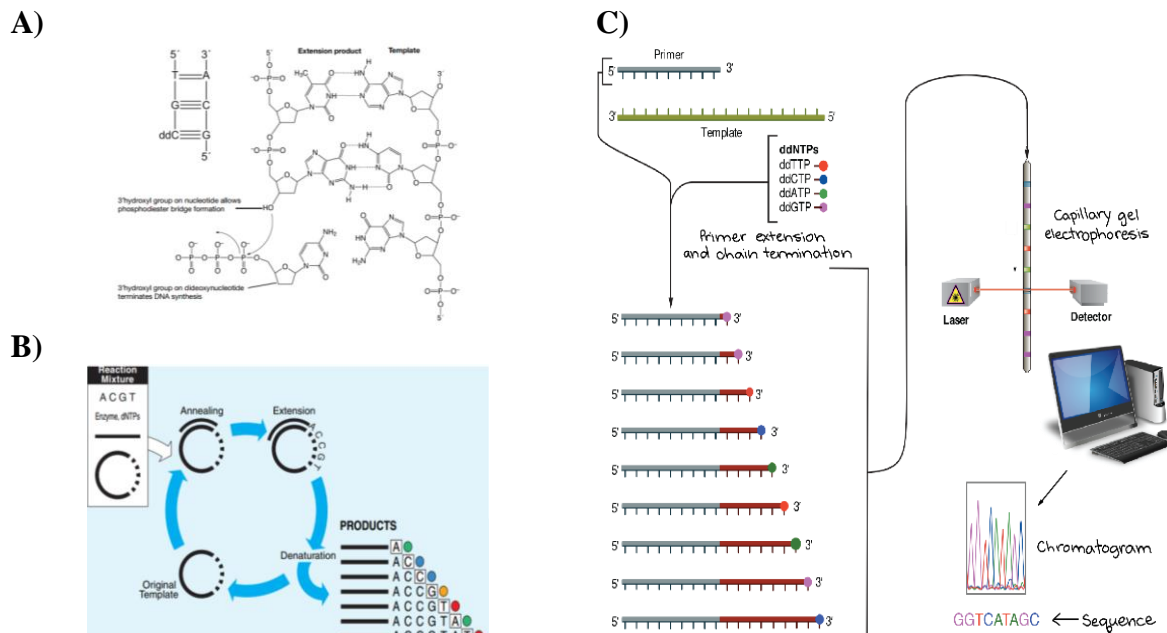


Figura 8 Secuenciación Sanger **A)** Síntesis y terminación de la cadena molde de ADN **B)** Proceso de secuenciación cíclica en un termociclador **C)** Electroforesis capilar y generación del cromatograma.

Fuente: (Applied Biosystems, 2009; GATC Biotech, 2018)

2.4. Mecanismos de evolución molecular

Los mecanismos de evolución molecular pretenden explicar la variabilidad genética dentro de una población. Los mecanismos de evolución se dan principalmente por dos mecanismos: las mutaciones y las recombinaciones (Aznar et al., 2009).

2.4.1. Mutaciones

Las mutaciones son cualquier cambio a nivel genético que puede ser transmisible a sus generaciones. Se puede generar de manera espontánea, por errores en la replicación del material

genético y por exposición a químicos, virus o radiación. Las mutaciones pueden darse a nivel nucleotídico o cromosómico. Las mutaciones nucleotídicas incluyen transiciones, transversiones, inserciones y deleciones, que pueden afectar el fenotipo produciendo una proteína distinta, o a su vez debido a que el código genético es degenerado, no tener efecto visible. Las cromosómicas pueden referirse al número de cromosomas, por ejemplo, aneuploidía, trisomía, poliploidía; o en características estructurales, duplicación, translocación o inversión (Singh, 2013).

2.4.2. Recombinación

La recombinación involucra el emparejamiento de cromosomas y el intercambio de material genético. La recombinación puede ser homóloga, es decir, entre moléculas de ADN con una secuencia similares; no homologa entre regiones que no presentan o presentan muy poca similitud como la realizada por transposones o integrones que introducen sus moléculas de ADN en plásmidos o en el ADN cromosómico; específica entre secuencias determinadas relativamente pequeñas; y replicativa aquella que produce copias de un segmento. La recombinación a diferencia de la mutación genera mayor variabilidad genética lo que le permite a una población adaptarse y evolucionar (Wolfe & Li, 2003). La recombinación se puede dar por transformación en donde secuencias extracelulares de ADN ingresan a la célula y se combinan con el cromosoma principal, transducción en donde el ADN externo ingresa a la célula bacteriana por medio de un bacteriófago que migra de célula en célula, o conjugación en donde el ADN de una bacteria principalmente contenido en un plásmido se traslada a otra bacteria por medio de pilis sexuales (Figura 4A) (Moreno et al., 2009).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Participantes

El presente trabajo de titulación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Humana, Nanomedicina y Nanobiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE bajo la dirección de la Dra. Patricia Jiménez, Dr. Marcelo Grijalva y M.Sc. María José Vallejo. Por parte del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo la Dra. Gabriela Jaramillo.

3.2. Zona de estudio

El trabajo de titulación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Humana, Nanomedicina y Nanobiología del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura - Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en la Av. General Rumiñahui s/n y Ambato, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Latitud: $0^{\circ}19'16.969''$ S, Longitud: $78^{\circ}26'32.381''$ O, Altura elipsoidal: 2523.067 (msnm) y cuyo jefe de laboratorio es el Dr. Marcelo Grijalva, M.D., Ph.D.

Los aislados clínicos fueron recolectados en el área de Bacteriología de los laboratorios clínicos del Hospital Carlos Andrade Marín, que se encuentra ubicado en las calles Portoviejo y Ayacucho, parroquia de Quito, cantón Quito, provincia de Pichincha, Latitud: $0^{\circ}12'18.51''$ S, Longitud: $78^{\circ}30'16.822''$, Altura elipsoidal: 2922.671 (msnm) y cuyo jefe de laboratorio es la Dra. Natalia Campoverde; y del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo, que se encuentra ubicado en la Av. Gran Colombia s/n y Yaguachi, parroquia de Quito, cantón Quito, provincia de Pichincha,

Latitud: 0°12'49.14'', Longitud: 78°29'51.071'', Altura elipsoidal: 2922.671 (msnm) y cuyo jefe de laboratorio es la Dra. Karina Reinoso.

La electroforesis capilar de cada una de las muestras fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo bajo la dirección de la Dra. Gabriela Jaramillo.

3.3. Periodo de tiempo de la investigación

El presente trabajo de titulación inició en el mes de mayo 2017 y finalizó en el mes de enero 2018.

3.4. Procedimientos

3.4.1. Colección y mantenimiento de aislados clínicos

3.4.1.1. Recolección de aislados clínicos de hemocultivos con crecimiento del Hospital Carlos Andrade Marín y del Hospital Eugenio Espejo

Las bacterias aisladas de hemocultivos con crecimiento se recolectaron en viales con medio de cultivo Agar Triptosa de Soya (TSA). Para ello cada vial se llenó con 1,5mL de agar TSA previamente preparado acorde a las indicaciones del proveedor. Posteriormente, los viales fueron autoclavados, rotulados y enviados a cada hospital donde el personal del laboratorio de microbiología se encargó de realizar un repique de la o las bacterias encontradas en hemocultivos dentro de los viales. Una vez recolectada la muestra, los viales fueron transportados al laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

3.4.1.2. Parámetros de selección de aislados

Se obtuvieron los antibiogramas (AST, por sus siglas en inglés) reportados por los hospitales para cada aislado clínico. Los aislados clínicos fueron enviados al Laboratorio de Referencia Europeo para la Identificación de Resistencia en Bacilos Gram negativos en Mont Godinne – Bélgica, donde se realizó la confirmación del perfil AST de las bacterias. Los criterios de inclusión de las muestras de trabajo fueron:

- Aislados clínicos provenientes de hemocultivos positivos que presentaron *Klebsiella pneumoniae* mediante la confirmación en Mont Godinne y/o la caracterización de los hospitales de referencia del Ecuador.
- Aislados clínicos del mismo paciente, pero tomadas en días diferentes.
- Aislados clínicos del mismo paciente tomadas el mismo día pero que se reportó diferente patrón de resistencia comparando la confirmación con la caracterización de los hospitales de referencia del Ecuador.

3.4.1.3. Mantenimiento de cultivos puros de *Klebsiella pneumoniae* y criopreservación

Los aislados clínicos seleccionados fueron replicados en cajas Petri con agar TSA. El cultivo se realizó por estrías y se incubó por 24 horas a 37°C. Con un asa estéril descartable se tomó tres colonias y se las colocó dentro de los crioviales Microbank, previamente rotulados. Los crioviales fueron refrigerados a 4°C por dos horas y a continuación almacenados en ultracongelación a -80°C.

3.4.1.4. Cultivo de cepas de trabajo

Las cepas seleccionadas fueron activadas, se tomó 100µL del criopreservante y se depositó en tubos Falcon que contenían 5mL de caldo corazón cerebro (BHI) y se incubó por 24 horas a

37°C. Transcurrido el tiempo, se tomó 100µL de la suspensión celular, se inocularon cajas Petri con agar BHI y se incubó por 24 horas a 37°C.

3.4.2. Extracción de ADN bacteriano

La extracción de ADN se realizó con el Kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen). El procedimiento a seguir consistió en colocar 3 asas llenas de cultivo bacteriano en un tubo de 2mL que contenía 1500µL de suero fisiológico. Se seteó el termobloque a 55°C. Se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 180µL de buffer de digestión (PureLink Genomic Digestion Buffer). Se añadió 20µL de proteinasa K (Invitrogen), se dió vórtex. Se incubó el tubo a 55°C, se dió vórtex ocasionalmente durante 1 hora, se añadió 20µL de RNasa A (Invitrogen), se dió vórtex y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 200µL de buffer de lisis (PureLink Lysis/Binding Buffer) y se dió vórtex hasta obtener una solución homogénea. Se añadió 200µL de etanol al 100% y se dio vórtex por 5 segundos. Se preparó una columna de sílica de separación. Se añadió todo el contenido en la columna de separación. Se centrifugó a 14100rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector con el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de colección. Se añadió 500µL de buffer de lavado 1 (Wash Buffer 1) a la columna y se centrifugó a 14100rpm por un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector con el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de colección, se añadió 500µL de buffer de lavado 2 (Wash Buffer 2), se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector con el filtrado. Se colocó la columna en un tubo estéril de 1,5mL. Se añadió 50µL de buffer de elución (Elution Buffer) y se incubó por un minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. Por último, se almacenó el ADN obtenido a -80°C.

3.4.2.1. Electroforesis en gel de agarosa

Para verificar el tamaño y la integridad del ADN extraído, se realizó corridas electroforéticas y se reveló el ADN en geles de agarosa. El gel para la visualización del ADN extraído se preparó al 0,8% (v/w) agarosa grado biología molecular (Invitrogen) en buffer TBE 1X.

Para cargar las muestras, se mezcló 2 μ L de buffer de carga (Blue/Orange Loading Dye 6X, Promega) con 8 μ L de ADN extraído. Se cargó 10 μ L de mezcla de cada muestra en cada pocillo a partir del segundo carril. En el primer carril se cargó 7 μ L de la mezcla de 5 μ L de marcador de peso molecular de 1Kb (1Kb DNA Ladder, Promega) con 2 μ L de buffer de carga. Los parámetros de corrida fueron de 120V por 1 hora. Finalmente, se observó la migración electroforética a través de un fotodocumentador (UVP BioDoc – Itm System) a una longitud de onda de 302nm.

3.4.2.2. Cuantificación de ADN bacteriano por Espectrofotometría

La cuantificación de ADN se la realizó mediante espectrometría en el equipo NanoDrop (Thermo Scientific). En el software, se seleccionó la cuantificación de ácidos nucleicos, ADN. Se limpió el pedestal con 1 μ L de Ácido Clorhídrico (HCl) 0,5N. Se colocó 1 μ L de agua ultrapura para verificar las longitudes de onda, se limpiaron los pedestales y a continuación se seteo el blanco en el equipo, para ello se colocó 1 μ L de buffer de elución. Finalmente, se cargó 1 μ L de cada muestra en cada pedestal y se realizó la cuantificación del ADN.

3.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa

3.4.3.1. PCR convencional de genes constitutivos de *Klebsiella pneumoniae*: *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi*

Los primers utilizados para la amplificación de los genes constitutivos (Tabla 3) fueron los descritos por Diancourt, et al. (2005) y por el Instituto Pasteur (2018). El tamaño del fragmento esperado de cada gen fue determinado mediante el uso del software en línea Primer-BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (ANEXO 1).

La amplificación de los genes constitutivos *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi* de *K. pneumoniae* se la realizó preparando en frío reacciones de 22,5µL con la enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerasa (Promega) junto con los reactivos mencionados en la Tabla 4 (a excepción del ADN) y congelando el master mix a -20°C por 45 minutos, transcurrido el tiempo se añadió el ADN; mientras que para el gen *rpoB* se utilizó la enzima Taq DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen), Tabla 5. Para el control negativo se reemplazó el ADN por agua ultrapura.

Tabla 3

Primers utilizados para la amplificación de los genes constitutivos de Klebsiella pneumoniae: rpoB, gapA, mdh, infB, tonB, phoE, pgi.^a

Gen	Función putativa del gen	Nombre del primer	Secuencias de nucleótidos de los primers	Tamaño del fragmento de PCR (pb)	Localización en el genoma (pb)
<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la RNA polimerasa	rpoB F rpoB R	5' GGCGAAATGGCWGAGAACCA 3' 5' GAGTCTTCGAAGTTGTAACC 3'	1076	228741-229797
<i>gapA</i>	Gliceraldehido 3-fostato deshidrogenasa	gapA F gapA R	5' TGAAATATGACTCCACTCACGG 3' 5' CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT 3'	663	2132726-2133388
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	mdh F mdh R	5' CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG 3' 5' CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG 3'	757	4790600-4791356
<i>infB</i>	Factor 2 de iniciación de la transcripción	infB F infB R	5' CTCGCTGCTGGACTATATTCG 3' 5' CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC 3'	463	4733286-4733748
<i>tonB</i>	Traductor de la energía periplásmica	tonB F tonB R	5' CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT 3' 5' ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG 3'	540	3167291 - 3167830
<i>phoE</i>	Fosforina E	phoE F phoE R	5' ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG 3' 5' TGATCAGAACTGGTAGGTGAT 3'	603	1077204-1076647
<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa	pgi F pgi R	5' GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC 3' 5' CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT 3'	718	288331-289048

^a Basado en la secuencia completa de *Klebsiella pneumoniae* HS11258 disponible en:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/815?genome_assembly_id=168877

Fuente: (Diancourt et al., 2005; Institut Pasteur, 2018)

Tabla 4

Componentes de la PCR para *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi*.

Reactivo	Concentración stock	Concentración Final	Volumen inicial (μL)
dNTPs	20mM	0,4mM	0,5
Primer Forward	30μM	0,2μM	0,17
Primer Reverse	30μM	0,2μM	0,17
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5
GoTaq® Flexi DNA Polimerasa	5U/μL	1U/ μL	0,2
Colorless Buffer	5X	1X	5
Agua	---	---	14,96
ADN	15ng/μL	1,5ng/μL	2,5
Volumen final (μL)			25

Fuente: (Modificado de Promega, 2016)

Tabla 5

Componentes de la PCR para *rpoB*.

Reactivo	Concentración stock	Concentración Final	Volumen inicial (μL)
dNTPs	20mM	0,2mM	0,25
Primer Forward	30μM	0,2μM	0,17
Primer Reverse	30μM	0,2μM	0,17
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,75
Taq DNA Polimerasa Recombinante	5U/μL	1U/ μL	0,2
Colorless Buffer	10X	1X	2,5
Agua	---	---	18,46
ADN	15ng/μL	1,5ng/μL	2,5
Volumen final (μL)			25

Fuente: (Modificado de Invitrogen, 2016)

Concluido el ensamblaje de la PCR, las muestras fueron llevadas al termociclador en donde se estableció un programa, previamente optimizado, para cada gen (Balarezo, 2014). En la Tabla 6 se detalla el programa para el gen *rpoB*, en la Tabla 7 para el gen *gapA*, en la Tabla 8 para el gen *mdh* y en la Tabla 9 para los genes *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi*.

Tabla 6*Programa de termociclado para la amplificación del gen rpoB.*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	94	2min	1
Denaturación	94	30s	
Annealing	58	30s	35
Extensión	72	1min	
Extensión Final	72	4min	1
Espera	4	10min	1

Fuente: (Modificado de Institut Pasteur, 2018; Balarezo, 2014)

Tabla 7*Programa de termociclado para la amplificación del gen gapA.*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	94	2min	1
Denaturación	94	30s	
Annealing	60	30s	35
Extensión	72	1min	
Extensión Final	72	4min	1
Espera	4	10min	1

Fuente: (Modificado de Institut Pasteur, 2018; Balarezo, 2014)

Tabla 8*Programa de termociclado para la amplificación del gen mdh.*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	94	2min	1
Denaturación	94	30s	
Annealing	61	30s	35
Extensión	72	1min	
Extensión Final	72	4min	1
Espera	4	10min	1

Fuente: (Modificado de Institut Pasteur, 2018; Balarezo, 2014)

Tabla 9*Programa de termociclado para la amplificación de los genes infB, tonB, phoE, pgi.*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	94	2min	1
Denaturación	94	30s	
Annealing	50	30s	35
Extensión	72	1min	
Extensión Final	72	4min	1
Espera	4	10min	1

Fuente: (Modificado de Institut Pasteur, 2018; Balarezo, 2014)

3.4.3.2. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR se realizó como previamente se describió, con algunas modificaciones, los gels de agarosa se prepararon al 1,5% (v/w) de agarosa grado biología molecular (Invitrogen) y se realizaron 3 calentamientos cada 15 minutos.

Se cargó 5 μ L de la mezcla de 3 μ L de producto de PCR mezclados con 2 μ L de buffer de carga (Blue Juice Gel Loading Dye 10X, Invitrogen) a partir del tercer pocillo. En el segundo pocillo se cargó el control negativo y en el primer y último pocillo se cargó 4,5 μ L de la mezcla de 2,5 μ L de marcador de peso molecular de 100bp con 2 μ L de buffer de carga. La corrida electroforética fue a 80V por 1 hora 30 minutos.

3.4.3.3. Purificación de Productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen). Se añadió 4 volúmenes de buffer de unión B2 (PureLink® Binding Buffer B2) a 1 volumen de producto de PCR. Se pipeteó la mezcla dentro de una columna de sílica previamente insertada en un tubo colector y se centrifugó a 13000rpm por 1 minuto, se descartó el filtrado. Se reinsertó la columna en el tubo colector, se añadió 650 μ L de buffer de lavado (Wash Buffer W1), se centrifugó a 13000rpm por 1 minuto, se descartó el filtrado, se armó nuevamente la columna y se centrifugó a máxima velocidad (14500rpm) por 2 minutos. Se colocó la columna en un tubo de 1,7mL, se añadió 25 μ L de buffer de elución (Elution Buffer) en el centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a máxima velocidad (14500rpm) por 2 minutos. Se almacenaron los productos de PCR purificados a -4C°.

Se realizó el proceso de electroforesis para determinar la calidad e integridad de los productos de PCR amplificados, el procedimiento que se siguió fue similar al detallado en el apartado 3.4.7.1.

3.4.4. Secuenciación Sanger

3.4.4.1. Secuenciación cíclica de genes constitutivos

La secuenciación cíclica de los genes constitutivos de *K. pneumoniae* se llevó a cabo con el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). La preparación del control y de las muestras utilizadas se detalla en la Tabla 10,11 y 12 (ANEXO 2 Y ANEXO 3). La concentración del producto de PCR purificado fue ajustada a 20ng/μL y la de los primers a 3,2pmol/μL (3,2μM). Se utilizó un solo primer, forward o reverse, a excepción del gen *rpoB* donde se llevó a cabo la secuenciación en ambos sentidos.

Tabla 10

Componentes de la secuenciación cíclica del control de cadena doble de ADN pGEM™-3Zf(+)

Reactivo	Concentración Stock	Cantidad por reacción	Volumen (1Rx) (μL)
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2,5X	1X	2
21M13 Control Primer	0,8pmol/μL	1,6pmol	2
pGEM-3Zf(+)	200ng/μL	150ng	0,75
Agua grado PCR	---	----	0,25
		Volumen final	5

Fuente: (Modificado de Applied Biosystems, 2016)

Tabla 11

Componentes de la secuenciación cíclica de los productos de PCR de *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi*.

Reactivo	Concentración Stock	Cantidad por reacción	Volumen (1Rx) (μL)
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2,5X	1X	2
Primer	3,2pmol/μL	3,2pmol	1
Producto PCR - ADN	20ng/μL	10ng	0.5
Agua grado PCR	---	----	1,5
		Volumen final	5

Fuente: (Modificado de Applied Biosystems, 2016)

Tabla 12

Componentes de la secuenciación cíclica de los productos de PCR de *rpoB*.

Reactivo	Concentración Stock	Cantidad por reacción	Volumen (1Rx) (μL)
BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2,5X	0,25X	0,5
Primer	3,2pmol/μL	3,2pmol	1
Producto PCR - ADN	20ng/μL	10ng	0.5
Agua grado PCR	---	----	3
		Volumen final	5

Fuente: (Modificado de Applied Biosystems, 2016)

Concluido el ensamblaje de la secuenciación cíclica, las muestras fueron llevadas al termociclador en donde se estableció el programa detallado en la Tabla 13 para los genes *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi*; y el detallado en la Tabla 14 para el gen *rpoB*.

Tabla 13

Programa de termociclado para la secuenciación cíclica de *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	96	1min	1
Denaturación	96	10s	
Annealing	50	5s	25
Extensión	60	4min	
Espera	4	10min	1

Fuente: (Applied Biosystems, 2016)

Tabla 14*Programa de termociclado para la secuenciación cíclica de rpoB.*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	96	1min	1
Denaturación	96	10s	
Annealing	60	5s	25
Extensión	60	4min	
Espera	4	10min	1

Fuente: (Modificado de Applied Biosystems, 2016)

3.4.4.2. Purificación de productos de secuenciación cíclica

La purificación de productos de secuenciación cíclica se realizó con el kit BigDye® XTerminator™ (Applied Biosystems) en platos de 96 pocillos. Para cada reacción de purificación se añadió en cada pocillo 11,5µL de Solución SAM y a continuación se colocaron los 5µL del producto de secuenciación cíclica y del control. Se pipeteó 2,5µL de la solución XTerminator previamente homogenizada mediante vórtex por más de 10 segundos. Se cubrió el plato con una película adhesiva transparente MicroAmp™ y se agitó la mezcla durante 30 minutos. Se centrifugó el plato a 1000rpm por 2 minutos, se removió la película adhesiva transparente, se añadió 10µL del Estándar de Secuenciación (ANEXO 4) (BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standar) en un pocillo libre, se colocó una septa y se llevó la placa al Analizador Genético 3500.

3.4.4.3. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se realizó en los Analizadores Genéticos Applied Biosystems 3100 del Laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología, y 3500 del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. Los equipos se programaron tomando en cuenta el módulo de corrida con BigDye XTerminator y los programas RapidSeq36_POP7 o FastSeq36_POP7.

3.5. Análisis Bioinformático

3.5.1. Curación de Secuencias

Tras obtener las secuencias en formato .ab1, se procedió a curarlas a través del software libre Sequencher 5.4.6. En las secuencias, se corrigieron las bases nitrogenadas de acuerdo a los picos A, C, T o G que se presentaban en el electroferograma. Para el gen *rpoB* se analizaron los electroferogramas obtenidos tanto de forward como de reverse y se obtuvo la secuencia consenso.

3.5.2. Identificación de perfiles alélicos y Secuencias Tipo (ST)

El número alélico de cada locus se obtuvo comparando la secuencia curada de cada gen con la base de datos del Instituto Pasteur disponible en el sitio web <http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>. La combinación de los 7 números alélicos, el llamado perfil alélico, hizo posible determinar la secuencia tipo a la que pertenecía cada muestra. El software BioNumeric v5.10 (Applied Maths, Sint Maartes-Latem, Bélgica) también fue utilizado como herramienta bioinformática para analizar el perfil alélico comparando las secuencias obtenidas con secuencias reportadas en el BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database).

3.6. Análisis de Datos

3.6.1. Frecuencia de Números Alélicos y Frecuencia de Secuencias Tipo

La frecuencia alélica es la proporción observada de un alelo específico respecto al conjunto de alelos que ocupan cada locus, la sumatoria de las frecuencias alélicas es igual a 1. Su cálculo es a partir de la fórmula:

$$Frecuencia\ alélica = \frac{\text{número de copias del alelo}}{\text{número de copias de todos los alelos en el locus}}$$

La frecuencia de Secuencias Tipo (ST) indica la proporción en la que una secuencia tipo se encuentra con relación al total de secuencias tipo, sus valores se obtienen a partir de la fórmula:

$$Frecuencia\ ST = \frac{\text{número de copias de una ST}}{\text{número de copias de todas las ST}}$$

3.7. Análisis Filogenéticos

3.7.1. Identificación de Complejos Clonales

La identificación de complejos clonales se realizó mediante el programa en línea eBURST disponible en <http://eburst.mlst.net/>, bajo la plataforma informática Java. Se ingresaron todos los perfiles alélicos con sus correspondientes secuencias tipo, en formato delimitado por TAB, sin encabezados y colocando en la primera columna las ST seguidas de los 7 números alélicos. El parámetro de comparación y similitud para la identificación de complejos clonales fue de 6 números alélicos o alelos en un total de 7 loci (6/7) y para grupos clonales 5/7.

3.7.2. Construcción del Árbol de Mínima Expansión (MSTree)

Se utilizó el software BioNumerics en donde se seleccionó la construcción de un árbol de mínima expansión para datos categóricos con remuestreo por permutación=200. Los datos de entrada fueron los perfiles alélicos de cada muestra.

3.7.3. Construcción del Árbol Filogenético

La construcción del árbol filogenético se realizó a partir de las secuencias concatenadas de los 7 loci para cada aislado analizado. En primera instancia, se realizó un alineamiento múltiple mediante la herramienta MUSCLE del software MEGA7. A continuación, se creó el árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud con bootstrap=500 (MLT).

3.7.4. Construcción de la red dividida (Split network)

La red dividida de las 28 secuencias tipo que representan a los aislados se construyó mediante el software SplitsTree4 utilizando el método de neighbor-net.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Colección y mantenimiento de aislados clínicos

A través de la caracterización fenotípica de los aislados clínicos obtenida por los Hospitales y su confirmación en el laboratorio de Mont Godinne se pudo determinar que de los 68 aislados correspondientes a *K. pneumoniae*, 64 cumplieron los criterios de inclusión de la muestra y 4 aislados clínicos fueron descartados por ser tomados el mismo día del mismo paciente y por presentar igual patrón de resistencia. Se identificaron 21 (32,8%) aislados clínicos con patrón de resistencia BLEE; 24 (37,5%) con patrón de resistencia CRE; 3 (4,7%) resistencia combinada BLEE/CRE y 16 (25,0%) presentaron patrón de resistencia sensibles (Tabla 15 y Figura 9).

Tabla 15

Patrón de resistencia de los aislados clínicos con sus correspondientes porcentajes.

Hospital	Patrón de Resistencia (%)				Total
	BLEE	CRE	CRE/BLEE	SENSIBLE	
HCAM	9 (14,1)	10 (15,6)	1 (1,6)	7 (10,9)	27 (42,2)
HEE	12 (18,8)	14 (21,9)	2 (3,1)	9 (14,1)	37 (57,8)
Total	21 (32,8)	24 (37,5)	3 (4,7)	16 (25,0)	64 (100,0)

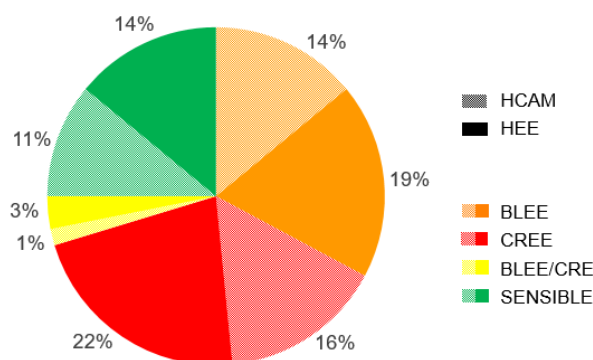


Figura 9 Patrón de Resistencia de los aislados clínicos por hospital.

Las bacterias fueron cultivadas en cajas Petri con agar TSA y criopreservadas en crioviales Microbank para mantener cepas puras. Los cultivos de trabajo se sembraron en caldo BHI con su correspondiente pase a agar BHI (Figura 10).

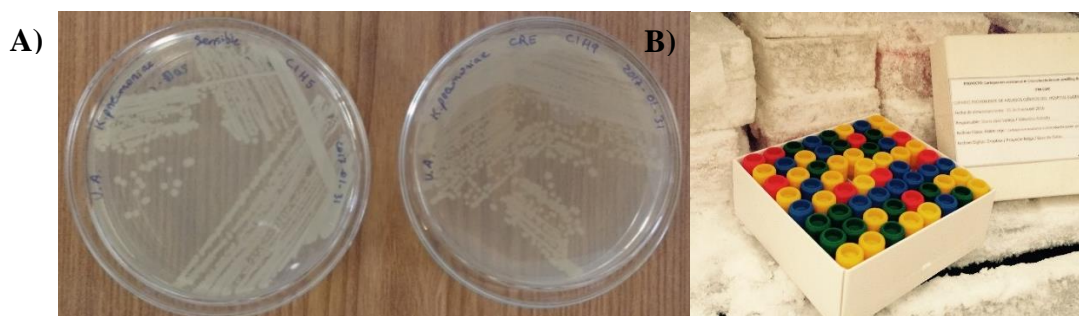


Figura 10 Aislados clínicos de pacientes con infecciones sistémicas producidas por *Klebsiella pneumoniae* **A)** Cultivo por estrías **B)** Criopreservación.

4.2. Amplificación de genes constitutivos de *Klebsiella pneumoniae*: *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi*; mediante PCR convencional

Posterior a la extracción de ADN total de las 64 muestras de trabajo, se ensamblaron las reacciones de PCR para cada gen constitutivo, como previamente se detalló. Las figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17 muestran los resultados de la amplificación de los genes *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi* respectivamente (ANEXO 5).

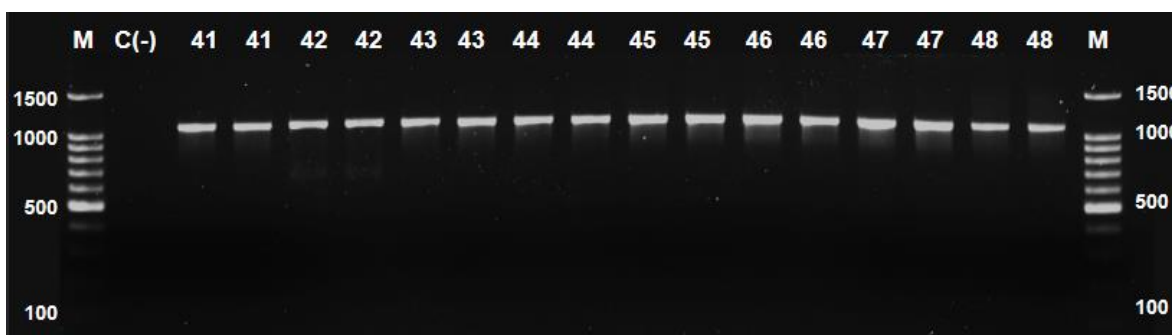


Figura 11 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen *rpoB* (1076pb) de *K. pneumoniae* por PCR convencional.

M: Marcador de peso molecular de 100bp. C(-): Control negativo de la PCR. 41-48: Muestras

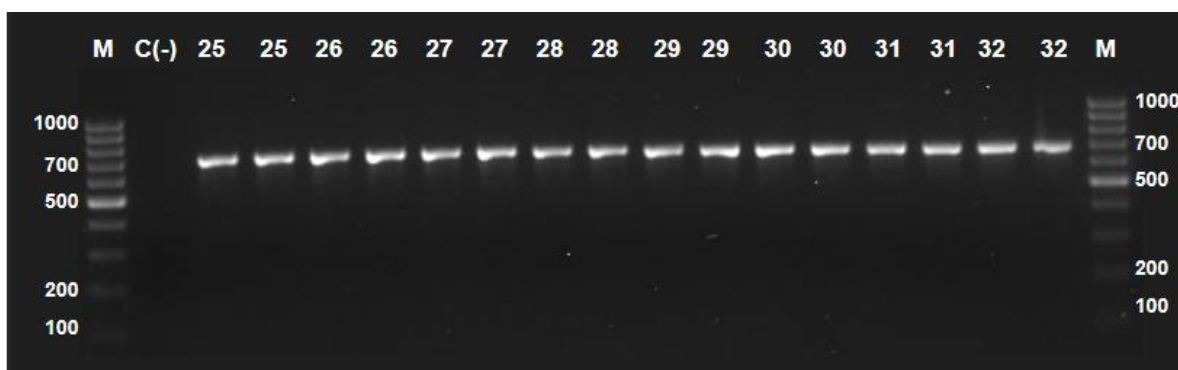


Figura 12 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen *gapA* (663pb) de *K. pneumoniae* por PCR convencional.

M: Marcador de peso molecular de 100bp. C(-): Control negativo de la PCR. 25-32: Muestras

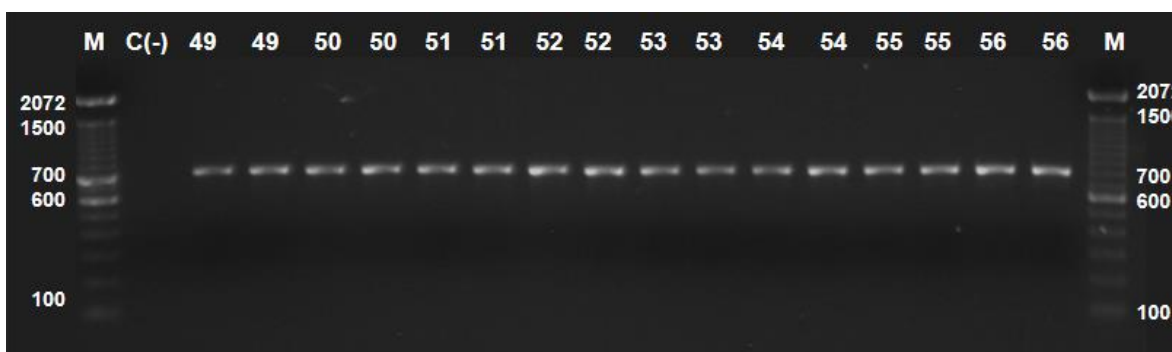


Figura 13 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen *mdh* (757pb) de *K. pneumoniae* por PCR convencional.

M: Marcador de peso molecular de 100bp. C(-): Control negativo de la PCR. 49-56: Muestras

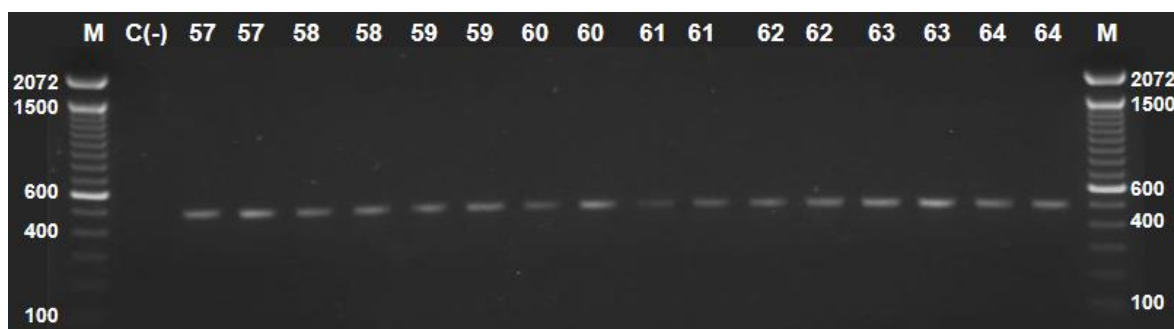


Figura 14 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen *infB* (463pb) de *K. pneumoniae* por PCR convencional.

M: Marcador de peso molecular de 100bp. C(-): Control negativo de la PCR. 57-64: Muestras

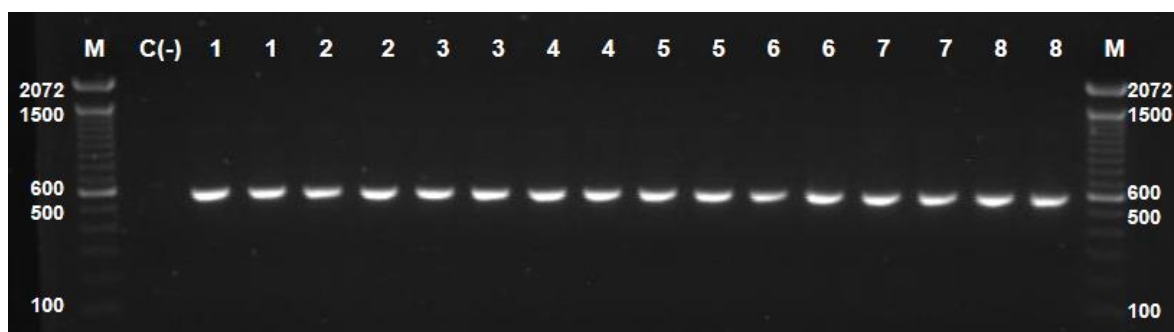


Figura 15 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen *tonB* (540pb) de *K. pneumoniae* por PCR convencional.

M: Marcador de peso molecular de 100bp. C(-): Control negativo de la PCR. 1-8: Muestras

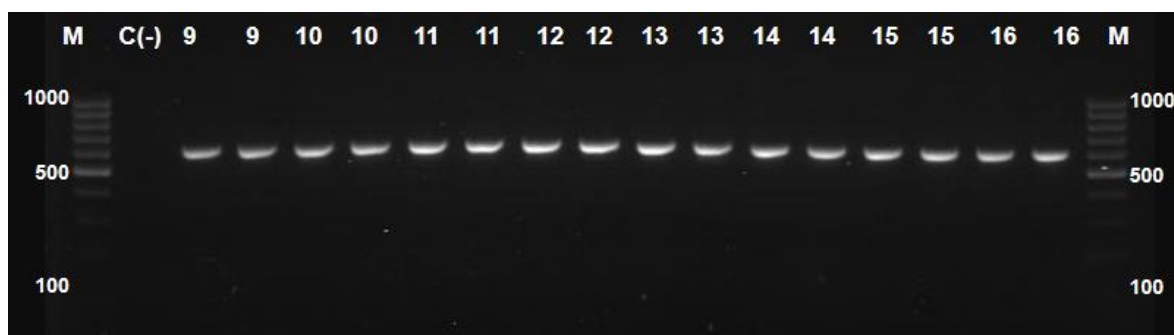


Figura 16 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen *phoE* (603pb) de *K. pneumoniae* por PCR convencional.

M: Marcador de peso molecular de 100bp. C(-): Control negativo de la PCR. 9-16: Muestras

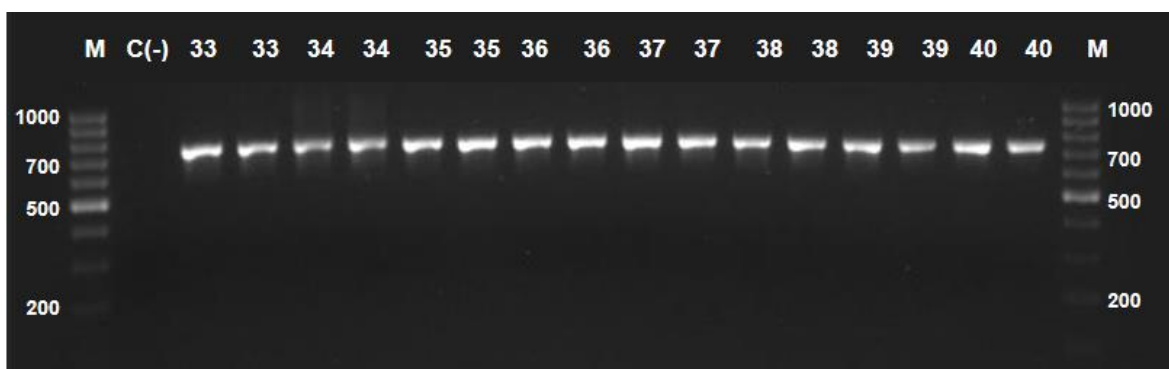


Figura 17 Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, para la amplificación del fragmento del gen *pgi* (718pb) de *K. pneumoniae* por PCR convencional.

M: Marcador de peso molecular de 100bp. C(-): Control negativo de la PCR. 33-40: Muestras

Se puede observar que las bandas corresponden al tamaño del fragmento de cada gen preanalizado con el programa Primer-BLAST y que los controles negativos de ADN no presentaron bandas.

Una de las dupletas, obtenidas en las reacciones de amplificación, fue purificada siguiendo el procedimiento previamente indicado, con el fin de eliminar excesos de reactivos de la PCR y productos inespecíficos tenues. Los resultados para cada gen constitutivo se pueden observar en el ANEXO 6.

4.3. Análisis Bioinformático

Se comprobó que las secuencias presentaron un valor de calidad superior a 15 y se procedió con la curación de secuencias para la posterior identificación de números alélicos (ANEXO 7).

4.3.1. Identificación de números alélicos y secuencias tipo

Una vez curadas las secuencias y comprobado que estas presenten un porcentaje de identidad igual o mayor al 97%, se procedió a determinar los números alélicos y las secuencias tipo (Tabla 16).

Tabla 16

Perfiles alélicos correspondientes a los 64 aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas.

Aislado	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	ST
M01	16	18	45	27	87	22	67	NA1
M02	2	3	1	1	10	1	19	13
M03	1	1	1	1	1	1	1	15
M04	16	18	45	27	87	22	67	NA1
M05	2	1	2	4	9	1	14	39
M06	2	3	87	1	12	1	26	629
M07	2	83	1	1	247	1	9	2623
M08	2	1	1	1	1	4	19	380
M09	4	1	2	52	1	1	7	307
M10	2	83	1	1	247	1	9	2623
M11	3	3	1	1	1	1	79	258
M12	3	4	6	1	7	4	40	392
M13	3	3	1	1	1	1	79	258
M14	2	20	23	1	1	1	19	129
M15	2	20	23	1	1	1	4	NA2
M16	2	1	2	1	1	10	25	1710
M17	2	3	1	1	10	1	19	13
M18	2	4	1	1	7	1	46	427
M19	3	3	1	1	1	1	79	258
M20	2	6	17	1	20	10	25	70
M21	3	3	1	1	1	1	79	258
M22	2	1	2	4	9	1	14	39
M23	2	60	11	1	4	8	24	628
M24	2	6	17	1	20	10	25	70
M25	2	6	17	1	20	10	25	70
M26	3	3	1	1	1	1	79	258
M27	4	1	2	52	1	1	7	307

Tabla 16 continuación*Perfiles alélicos correspondiente a los 64 aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas.*

Aislado	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	ST
M28	2	3	87	1	12	1	26	629
M29	1	1	1	1	1	1	1	15
M30	1	1	1	1	1	1	1	15
M31	18	22	26	23	31	13	49	138
M32	18	22	26	23	31	13	49	138
M33	2	1	2	4	9	1	14	39
M34	2	1	2	4	9	1	14	39
M35	2	1	2	4	9	1	14	39
M36	2	3	87	1	12	1	26	629
M37	3	3	1	1	1	1	79	258
M38	3	3	1	1	1	1	79	258
M39	3	3	1	1	1	1	79	258
M40	3	3	1	1	1	1	79	258
M41	2	3	1	1	10	1	19	13
M42	2	3	1	1	10	1	19	13
M43	2	1	169	1	232	7	13	1910
M44	16	18	21	27	39	22	67	641
M45	2	1	2	4	9	1	14	39
M46	4	3	1	36	9	10	14	661
M47	2	1	2	4	9	1	14	39
M48	4	4	1	1	7	4	10	1
M49	2	1	2	4	9	1	14	39
M50	2	1	2	4	9	1	14	39
M51	4	4	1	1	7	4	10	1
M52	2	3	87	1	12	1	26	629
M53	2	1	2	3	27	1	39	219
M54	2	1	2	4	9	1	14	39
M55	2	3	1	1	10	1	19	13
M56	2	3	2	1	10	1	13	66
M57	2	5	1	1	7	1	6	2648
M58	3	1	2	1	12	1	2	NA3
M59	2	1	2	1	9	1	14	667
M60	2	5	1	1	10	1	139	562
M61	3	3	1	1	1	1	79	258
M62	2	6	17	1	20	10	25	70
M63	3	3	1	1	1	1	79	258
M64	2	1	1	1	10	4	13	25

4.4. Análisis de Datos

4.4.1. Frecuencia de Números Alélicos

Se determinó que para los genes constitutivos *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, y *tonB* existieron 6, 10, 11, 7, 13, 7 y 20 números alélicos, respectivamente. Siendo *tonB* y *phoE* los loci más polimórficos y *gapA*, *pgi* y *rpoB* los menos variables. Los números alélicos con mayor frecuencia para cada locus fueron *rpoB*-1 con 0,719; *pgi*-1 con 0,703, *gapA*-2 con 0,594; *mdh*-1 con 0,453; *infB*-1 y -3 ambos con 0,344 y *tonB*-12 con 0,188 (Figura 18 y Tabla 17).

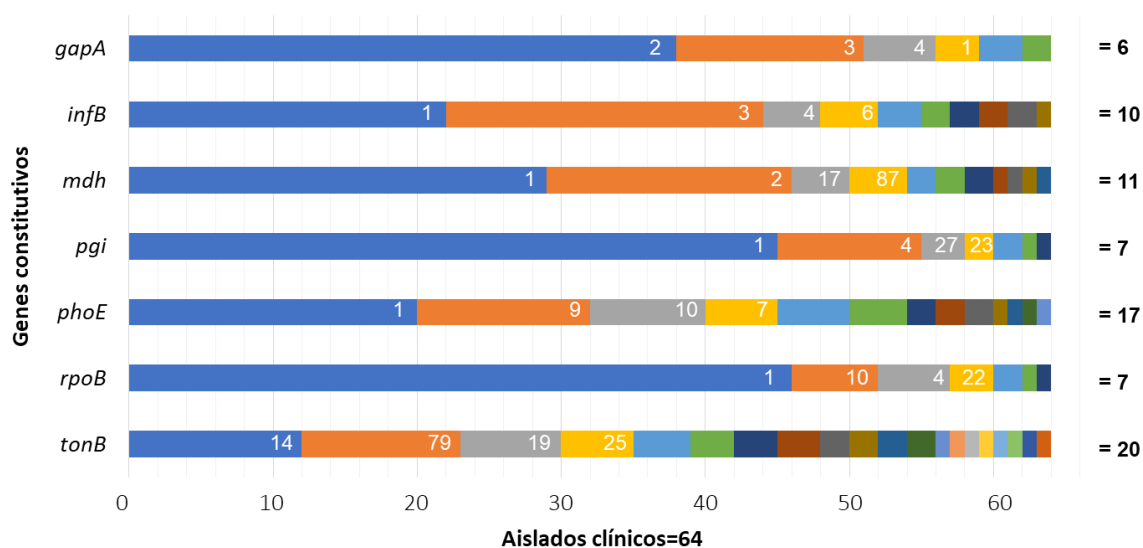


Figura 18 Frecuencias de los números alélicos

Tabla 17
Frecuencias de números alélicos

Locus	NA ¹	N ²	F ³	Locus	NA ¹	N ²	F ³	Locus	NA ¹	N ²	F ³
<i>gapA</i>	1	3	0,047	<i>pgi</i>	1	45	0,703	<i>tonB</i>	1	3	0,047
	2	38	0,594		3	1	0,016		2	1	0,016
	3	13	0,203		4	10	0,156		4	1	0,016
	4	5	0,078		23	2	0,031		6	1	0,016
	16	3	0,047		27	3	0,047		7	2	0,031
	18	2	0,031		36	1	0,016		9	2	0,031
<i>infB</i>	1	22	0,344		52	2	0,031		10	2	0,031
	3	22	0,344		1	20	0,313		13	3	0,047
	4	4	0,063		4	1	0,016		14	12	0,188
	5	2	0,031	7	5	0,078	19		7	0,109	
	6	4	0,063	9	12	0,188	24		1	0,016	
	18	3	0,047	10	8	0,125	25		5	0,078	
	20	2	0,031	12	5	0,078	26		4	0,063	
	22	2	0,031	20	4	0,063	39		1	0,016	
	60	1	0,016	27	1	0,016	40		1	0,016	
83	2	0,031	31	2	0,031	46	1		0,016		
<i>mdh</i>	1	29	0,453	39	1	0,016	49		2	0,031	
	2	17	0,266	87	2	0,031	67		3	0,047	
	6	1	0,016	232	1	0,016	79		11	0,172	
	11	1	0,016	247	2	0,031	139	1	0,016		
	17	4	0,063	<i>rpoB</i>	1	46	0,719	1	3	0,047	
	21	1	0,016		4	5	0,078	2	1	0,016	
	23	2	0,031		7	1	0,016	7	1	0,016	
	26	2	0,031		8	1	0,016	8	1	0,016	
	45	2	0,031		10	6	0,094	10	6	0,094	
87	4	0,063	13		2	0,031	13	2	0,031		
169	1	0,016	22		3	0,047	22	3	0,047		

¹ NA: número alélico.

² N: cantidad de aislados por cada número alélico.

³ F: frecuencia de los números alélicos.

4.4.2. Frecuencia de Secuencias Tipo

En los 64 aislados clínicos analizados se pudo identificar la presencia de 28 secuencias tipo, de las cuales 25 se encontraban reportadas en la base de datos del Instituto Pasteur y 3 fueron nuevas (Tabla 18).

La secuencia tipo predominante en el presente estudio fue la ST258 con una frecuencia del 17,2% (11/64), seguida de la ST39 con 15,6% (10/64); la ST13 presentó el 7,8% de secuencias tipo (5/64). ST40 y ST629 mostraron cada una, un 6,3% (4/64). ST15 un 4,7% (3/64). ST1, ST138, ST307, ST2623, STNA1 se encontró en una frecuencia de 3,1% (2/64) y las 17 ST restantes estuvieron presentes en un 1,6% (1/64) cada una (Figura 19).

Tabla 18

Frecuencias de las Secuencias Tipo.

Secuencia Tipo	Cantidad de Aislados (N)	Frecuencia ST
258	11	0,172
39	10	0,156
13	5	0,078
70	4	0,063
629	4	0,063
15	3	0,047
1	2	0,031
138	2	0,031
307	2	0,031
2623	2	0,031
NA1	2	0,031
25	1	0,016
66	1	0,016
129	1	0,016
219	1	0,016
380	1	0,016
392	1	0,016
427	1	0,016
562	1	0,016
628	1	0,016
641	1	0,016
661	1	0,016
667	1	0,016
1710	1	0,016
1910	1	0,016
2648	1	0,016
NA2	1	0,016
NA3	1	0,016
Total	64	1

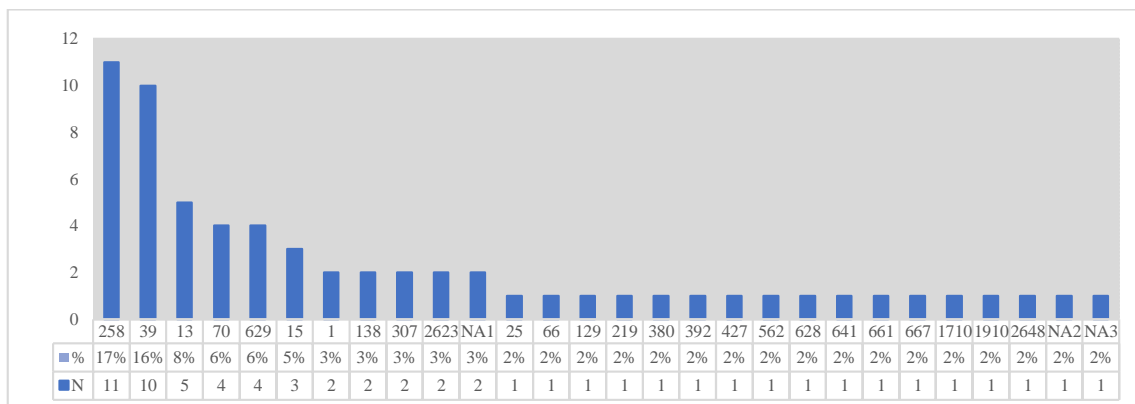


Figura 19 Frecuencias de Secuencias tipo

4.5. Análisis Filogenético

4.5.1. Identificación de Complejos Clonales

La identificación de complejos y grupos clonales se realizó a través del software eBURST, se pudo identificar 2 complejos clonales y 3 grupos clonales y 15 secuencias tipo independientes o singletons (Figura 20).

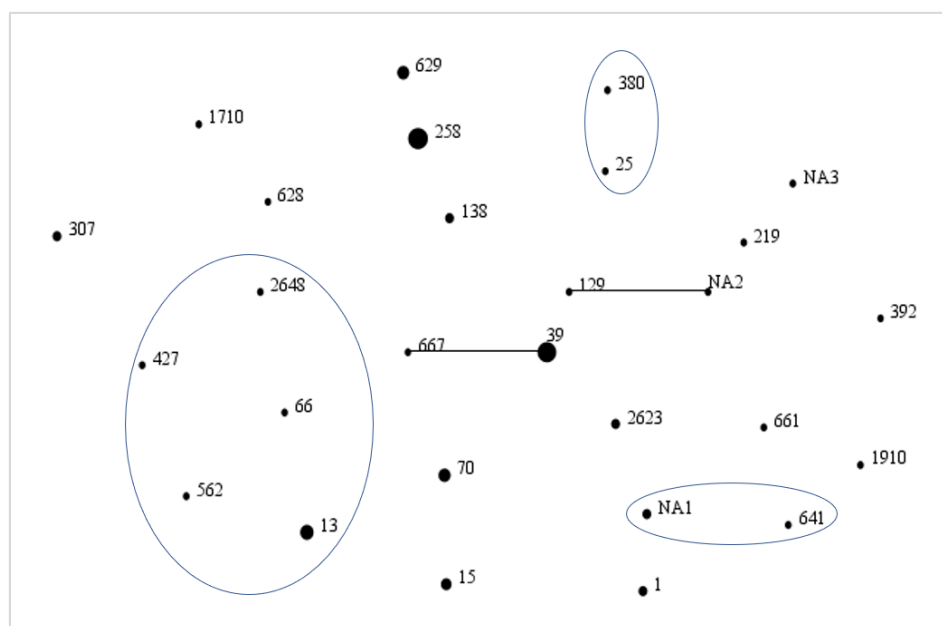


Figura 20 Agrupamiento clonal de *Klebsiella pneumoniae* aislada de hemocultivos mediante eBURST.

El primer complejo clonal (CC1) incluyó a 11 aislados clínicos, 10 de la ST39 y 1 de la ST667. El 72,72% (8/11) fueron CRE, 18,18% (2/11) BLEE y 9,09% (1/11) BLEE/CRE.

El segundo complejo clonal (CC2) incluyó a las STNA2 y ST129, ambas con 1 solo aislado de 64. El 100% del complejo clonal perteneció al patrón de resistencia Sensible.

En el primer grupo clonal (GC1) estuvieron incluidas las ST13, ST66, ST427, ST562 y ST2648 con 5 aislados para ST13 y un aislado para cada una de las ST restantes. El 44,44% (4/9) fueron BLEE, 33,33% (3/9) fueron CRE, 22,22% (2/9) fueron sensibles.

El segundo grupo clonal (GC2) incluyó a un aislado BLEE/CRE para ST25 y un aislado sensible para ST380.

El tercer grupo clonal (GC3) incluyó 3 aislados sensibles, 2 para STNA1 y 1 para ST641.

Las 15 ST restantes que representaban a 37 de 64 aislados, fueron denominadas singletons debido a que difieren en más de 2 de 7 de sus alelos. Los patrones de resistencia para estas secuencias fueron 40,54% (15/37) BLEE, 35,14% (13/37) CRE, 2,70% (1/37) BLEE/CRE y 21,62% (8/37) sensibles. La ST258 presentó la mayor frecuencia dentro de los singletons con 17,2% (11/37 aislados).

4.5.2. Árbol de la mínima expansión

El árbol de mínima expansión se construyó con el uso del software BioNumerics a partir del perfil alélico. Los números representan las secuencias tipo de los aislados analizados. Se puede ver que mientras más corta sea la línea entre dos entradas más relación genética existirá, de igual forma, mientras más grande sea el círculo de cada ST más aislados contendrá. Los grupos clonales

obtenidos a partir de eBURST se encuentran resaltados siendo CC1=rojo, CC2=azul, GC1=verde, GC2=amarillo, GC3=morado y Singletons no se encuentran resaltados (Figura 21).

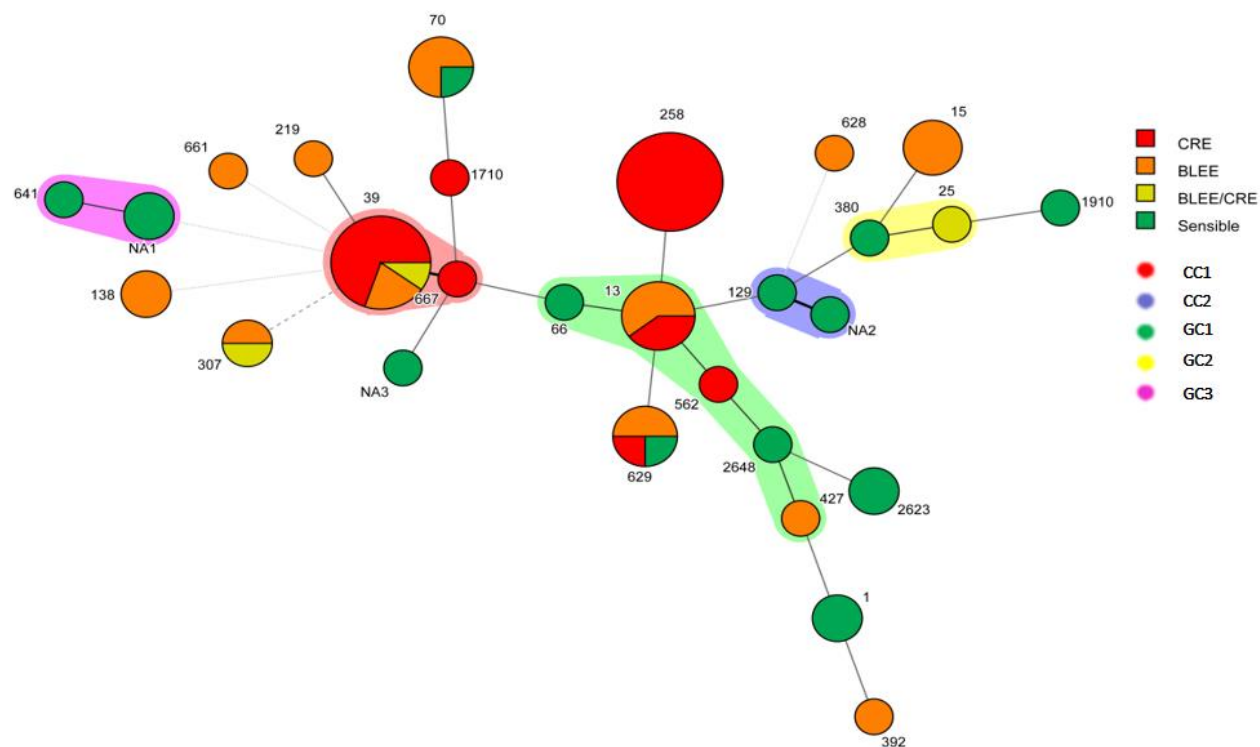


Figura 21 Árbol de mínima expansión de 64 aislados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de hemocultivos. Software BioNumerics.

4.5.3. Construcción del Árbol Filogenético

Las secuencias concatenadas de los 7 loci tubo una extensión de 3012 pares de bases, a excepción de las secuencias concatenadas de los aislados M31 y M32 que presentaron 3018 pb. A través del software MEGA7 se construyó el árbol filogenético usando el método de agrupación de máxima verosimilitud (ML) (Figura 22).

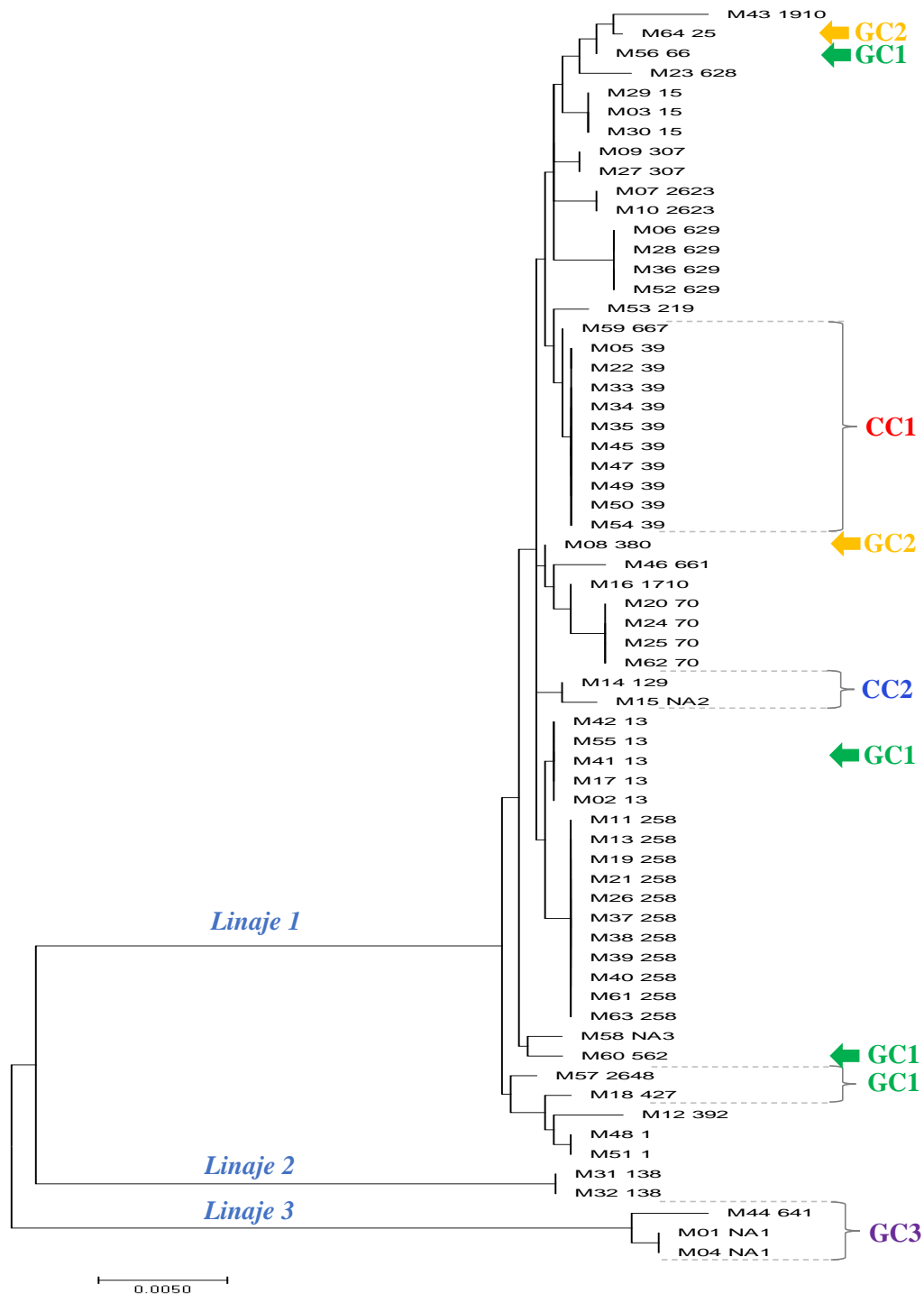


Figura 22 Dendrograma generado a partir de la relación de los perfiles alélicos de 64 aislados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de infecciones sistémicas. Método de máxima verosimilitud, MEGA7

4.5.4. Construcción de la red dividida (Split network)

En el diagrama de red dividida (Split network) se puede observar que la población bacteriana está constituida por tres linajes y que los grupos y complejos clonales identificados por eBURST no se mantienen en su totalidad a excepción del CC1, CC2 Y GC3 (Figura 23).

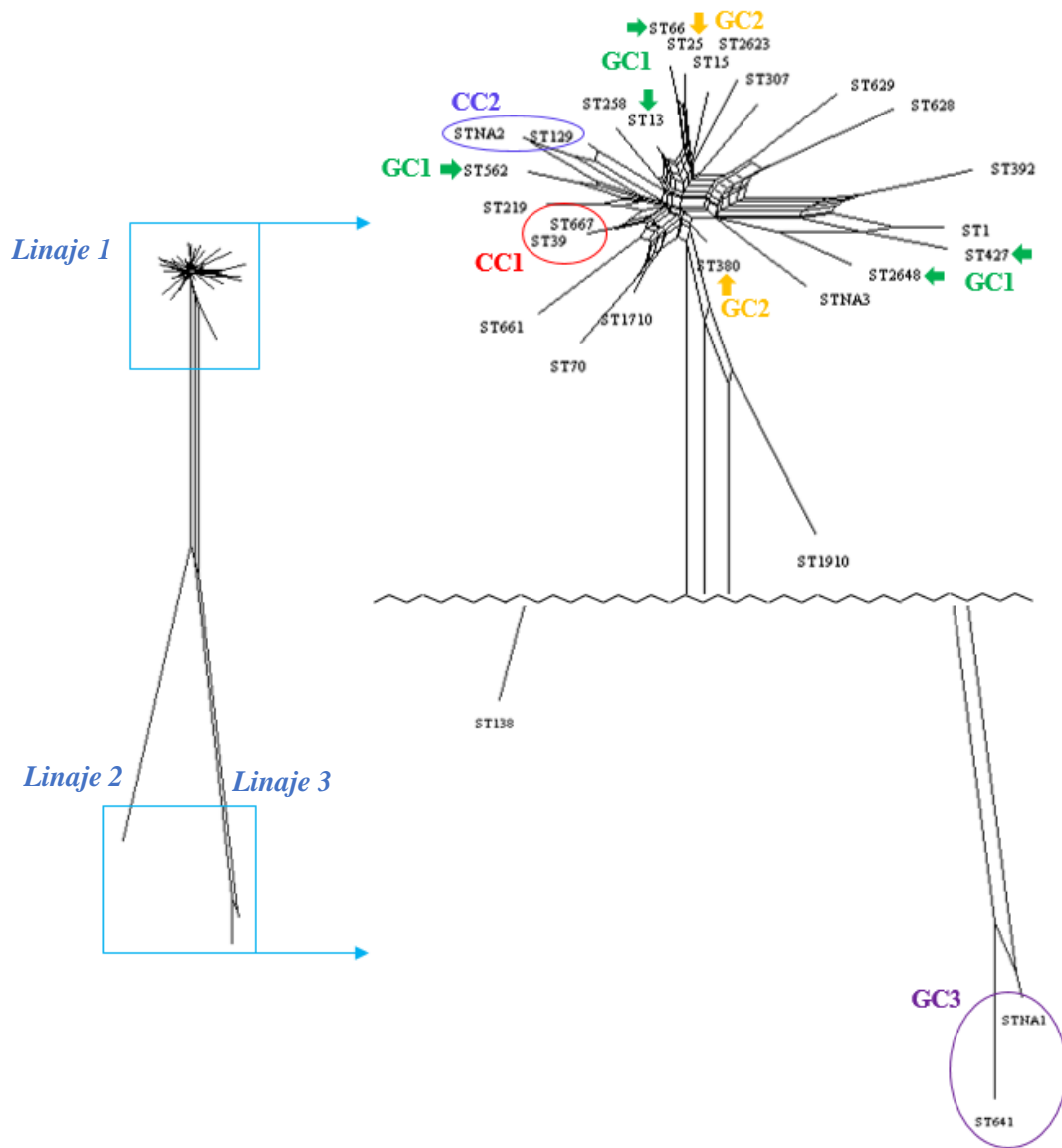


Figura 23 Red dividida (Split network) generada a partir de la relación de las 28 secuencias tipo de los 64 aislados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de infecciones sistémicas.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* son un grave problema los pues ocupa el primer lugar entre las infecciones bacterianas en el Hospital Carlos Andrade Marín y el segundo en el Hospital de Especialidades Eugenio Espejo (Escobar, Tapia, Gavilanes, Carlos, & Marín, 2014). *Klebsiella pneumoniae* muestra progresivamente mayores tasas de resistencia a los antimicrobianos de elección. Las tasas de mortalidad por infecciones por *K. pneumoniae* son igualmente cada vez más altas (Fariñas & Martínez, 2013).

Para la secuenciación de un material genético específico, en este caso de ADN, es necesario amplificar el fragmento deseado mediante la PCR. Uno de los componentes esenciales para esta técnica es la ADN Polimerasa. Para los sistemas *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi* se utilizó una GoTaq® Flexi DNA Polimerasa que ofrece una robusta amplificación igual a la de una Taq polimerasa convencional (Promega, 2016), sin embargo al no ser una enzima hot-start fue necesario congelar el master mix previa a la adición del ADN, con el fin de obtener un producto específico. Para el sistema *rpoB*, el uso de GoTaq® Flexi DNA Polimerasa resultó en baja calidad e inespecificidad (hasta 3 bandas inespecíficas superiores e inferiores a la banda esperada de 1076pb), por lo que fue necesario utilizar la enzima Taq DNA Polimerasa Recombinante que presenta mayor fidelidad, es hot-start y es recomendada para la secuenciación de ADN (Invitrogen, 2016).

La guía de Applied Biosystems para la secuenciación cíclica (Applied Biosystems, 2016) indica que se debería utilizar 8µL de BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix. Sin embargo, para los sistemas *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi* se utilizó 2µL y para *rpoB* 0,5µL. Sol-Church y Frenck (2014), indican que para optimizar este proceso se puede partir de una

dilución de BigDye™ Terminator de ¼ y es posible reducirla hasta 1/32 sin afectar la calidad de la secuenciación. El sistema *rpoB* requirió una optimización adicional, el aumento de la temperatura de annealing de 50°C a 60°C. Applied Biosystems (2009) menciona que, la temperatura de annealing en el proceso de termociclado puede ser aumentada hasta 60°C con el fin de evitar la formación de estructuras secundarias y complementariedades que impidan la generación de los fragmentos, en este estudio dadas principalmente el primer reverse.

Las purificaciones del producto de PCR y del producto de secuenciación cíclica son necesarias para evitar que los contaminantes afecten los procesos subsecuentes. De los productos de la PCR, el exceso de primers genera ruido en el cromatograma, el exceso de dNTPs afecta el balance propio de dNTPs/ddNTPs del BigDye Terminator disminuyendo la cantidad de fragmentos cortos, y la presencia de productos inespecíficos resulta en ruido y baja calidad de secuenciación. De los productos de la secuenciación cíclica, componentes como las sales y alcoholes pueden inhibir la electroforesis capilar, mientras que los ddNTPs no incorporados y exceso de dNTPS pueden obstruir la señal e interferir en el llamamiento de las bases (Applied Biosystems, 2007).

La técnica de MLST fue escogida para la caracterización de *K. pneumoniae* debido a que es la técnica ideal para la identificación de clones en una amplia gama de especies bacterianas. En esta técnica se analiza parte del genoma de la bacteria y gracias a las herramientas bioinformáticas actuales, el análisis y la transmisión de datos sintetizados en perfiles alélicos permiten determinar las relaciones de manera puntual e inferir patrones de descendencia filogenética. Esta técnica no es sensible a la identificación de bandas ni a la baja reproducibilidad entre laboratorios como es el caso de la técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), ni tampoco es susceptible a los ojos de un operador como es el caso de caracterizaciones fenotípicas (Carriço, Sabat, Friedrich, & Ramirez, 2013). Los Análisis de Multilocus – Número Variable de Repeticiones en

Tandem (VNTR) conocido como MLVA, es la única técnica comparable con MLST, incluso es más económica, pero se requiere de bases de datos integradas que por el momento solo existen para ciertas especies, así como también estudios de los marcadores requeridos para mejorar su poder discriminatorio en *Klebsiella pneumoniae* (Derakhshan, Najar-Peerayeh, & Bakhshi, 2017). Por todas estas razones MLST se ha convertido en el gold standard para la vigilancia epidemiológica a largo plazo.

De las 64 *K. pneumoniae* obtenidas de infecciones sistemas de los hospitales Carlos Andrade Marín y Eugenio Espejo se encontró que el 32,8% fueron BLEE, es decir pueden presentar resistencia a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, quinolonas y/o aminoglucósidos exceptuando a los carbapenémicos (Xu et al., 2017). Este porcentaje es cercano al 42% de prevalencia de BLEE en América Latina; por otro lado, 37,5% fueron CRE siendo resistentes a todos los antimicrobianos incluidos los carbapenémicos (ertapenem, meropenem y/o imipenem); 4,7% fueron BLEE/CRE, es decir no presentaron resistencia únicamente a uno de los medicamentos carbapenémicos; 25% fueron sensibles, es decir no presentaron resistencia a ningún medicamento o, a su vez, presentaron resistencia propia a ampicilina, carbenicilina, piperacilina o ticarcilina. De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (2015), entre el 2009 al 2014, *K. pneumoniae* pasó de ser sensible a carbapenémicos a mostrar resistencia en un 15% de aislados analizados. En el presente estudio la tasa de resistencia general fue de 37,5% de aislados estudiados. Dentro del hospital existen factores de riesgo que incrementan la resistencia a antimicrobianos como son el uso extensivo de cefalosporinas de tercera generación, largas estancias hospitalarias, infecciones repetitivas, procedimientos invasivos o transferencia por movimiento entre pacientes, profesionales de la salud y familiares (Christian, Roye-Green, & Smikle, 2010).

El análisis de genes constitutivos de una especie permite inferir con precisión los parámetros poblacionales e inferir las relaciones filogenéticas (Pérez-Losada, Cabezas, Castro-Nallar, & Crandall, 2013). En este sentido, eBURST utiliza un modelo de evolución bacteriana en el que asume que los genotipos aumentarán en frecuencia en la población, resultando nuevas variantes debido a la acumulación de mutaciones y/o recombinaciones. Obtener un porcentaje de identidad igual o mayor al 97% entre la secuencia encontrada frente a los alelos de referencia indica que la secuencia obtenida realmente corresponde al gen analizado (Richter & Rossello-Mora, 2009).

Diancourt, et al. (2005) indica que el gen *tonB* fue elegido como gen constitutivo debido a la gran variación nucleotídica que presenta, lo que corresponde con lo encontrado en el presente estudio pues *tonB* presenta 20 números alélicos diferentes. El gen *rpoB* fue considerado como control de que realmente la muestra analizada corresponde a una *Klebsiella pneumoniae*, además no presenta tanta variación. En el presente estudio, se encontró al gen *rpoB* en los 64 aislados y fue el segundo gen menos variable, después de *gapA*, con 7 números alélicos distintos. También, se determinó que el número de alelos por locus fue de 10,6 (6 para el locus menos polimórfico *gapA* y 20 para el locus más polimórfico *tonB*). Estos hallazgos son similar a lo reportado por Diancourt, et al. (10,7) en un estudio de 67 aislados clínicos donde la diversidad alélica varía entre 6 a 21 números alélicos distintos entre los siete loci secuenciados.

La variación en las frecuencias alélicas constituye un proceso evolutivo denotado por mutaciones, recombinaciones o principalmente por selección en donde factores epigenéticos como las condiciones ambientales afectan el fenotipo y consecuentemente el genotipo de una población. Esto en general representa el hecho de que una población con mayor variabilidad genética tiene mayor oportunidad de sobrevivir (Hall & Hallfrimsson, 2008; Ridley, 2004). Sin embargo, el presente estudio no estuvo destinado a analizar la genética poblacional y solo nos permite

comprobar que una población bacteriana presenta diferentes frecuencias alélicas en los loci analizados lo que le permite adaptarse a diferentes ambientes.

Las técnicas de tipificación molecular, en este caso la técnica de MLST, tienen como reto determinar la prevalencia de los clones y su importancia clínica con el fin de establecer medidas de manejo (Wang et al., 2013). Un vistazo general de los fenotipos encontrados en *K. pneumoniae* podría sugerir la presencia de un solo clon prevalente, debido a que el porcentaje de BLEE y CRE es alto (75%) y según Hernández, et al., (2005), *K. pneumoniae* productoras de BLEE y su evolución a CRE están clonalmente relacionadas. Sin embargo, a través de la caracterización genotípica se pudo identificar que en la población analizada si existe clonalidad entre cepas debido a que de 64 aislados clínicos de *K. pneumoniae* se identificaron 28 ST diferentes, pero al agruparlos, se vio que estas formaron 2 complejos clonales, 3 grupos clonales y 15 singletons. Según Fariñas y Martínez (2013), en los últimos años, las infecciones comunitarias causadas por *K. pneumoniae* están cobrando relevancia, a ello se debe la gran diversidad de ST sin ligación a un complejo o a un grupo clonal. Esto indica que la bacteria estudiada ha sobrepasado el medio intrahospitalario y que en la comunidad sus patrones de resistencia están ligados a varias condiciones como la edad avanzada, hospitalización previa, cirugías, infecciones en el tracto urinario, diabetes, tratamiento antibiótico empírico, infecciones en el tracto respiratorio, neumonía, inmunodepresión, entre otros (Rodríguez et al., 2004).

El árbol de mínima expansión (MSTree) se lo construyó con el fin de observar, de manera interactiva, como ha se ha llevado a cabo la micro-evolución y la epidemiología de la población. Se aplicó remuestreo por permutación debido a que es el tipo de muestreo usado cuando se analiza el perfil alélico debido a que presenta pocas variables categóricas a analizar (7 loci), comparado

con una secuencia de ADN en donde el mejor método de remuestreo es el bootstrap (Applied Maths, 2016).

Dentro de los grupos, complejos clonales o singletons se observó variabilidad de los patrones de resistencia, esto se debe a que el aspecto fenotípico de una bacteria se encuentra bajo presión selectiva, lo que indica que, la susceptibilidad antibiótica no es una prueba útil en estudios epidemiológicos. La terapia antibiótica previa, influencia la condición de las cepas de la flora normal del individuo, causando la muerte de las sensibles y la proliferación de las resistentes las cuales activarán genes de resistencia ya existentes o codificarán genes de resistencia adquiridos, que transmitirán a las siguientes generaciones (Christian et al., 2010). Los aislados clínicos que se encuentran dentro de un complejo o grupo clonal comparten características como sus factores de virulencia y perfil metabólico (Brisse et al., 2009).

La dispersión clonal en este ensayo se observa en la cantidad de aislados para una secuencia tipo determinada, por ejemplo, la ST258 se encuentra con una frecuencia de 17,2% (11/64) y la ST39 con 15,6% (10/64). Se considera que estas secuencias tipo se encuentran en estado de clon emergente y son indistinguibles en su perfil alélico pero, con el tiempo, se diversificarán y producirán variantes de locus único (SLV) (Aanensen & Spratt, 2005). Sin embargo, de estas secuencias tipo, el 85,71% (18/21) fueron CRE, 9,52% (2/21) fueron BLEE y el 4,76% (1/21) restante fue BLEE/CRE, lo que indica que las bacterias están pasando de ser resistentes a ser muy resistentes sin que los dos únicos fármacos con los que se trata al paciente en la actualidad, colistina y tigeciclina, tengan efecto. Por ello, *Klebsiella pneumoniae* se encuentra en la lista de patógenos humanos con prioridad crítica para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (Organización Mundial de la Salud, 2017).

En relación a la distribución de secuencias tipo encontradas en el presente estudio, ST258 se observó con mayor frecuencias (17,2%), esta ST es un clon reconocido de *Klebsiella pneumoniae*, es la más prevalente tiene a nivel mundial y está asociada a la dispersión de cepas resistentes a carbapenémicos (Córdova et al., 2012; Institut Pasteur, 2018; Wang et al., 2013).

ST39 fue la segunda ST prevalente en el estudio con un 15,6% (10/64), formó un complejo clonal con la ST667 diferenciándose únicamente en el locus *pgi*, lo que sugiere que la ST667 surgió por la adquisición del número alélico *pgi*-1.

ST13 fue la tercera ST prevalente con un 7,8% (5/64), está asociada con bacterias resistentes a carbapenémicos (Institut Pasteur, 2018), al igual que se vio en el presente estudio en un 40% (2/5). ST13 conformó un grupo clonal junto con ST66, ST427, ST562 y ST2648 cuyas frecuencias fueron de 1,6% (1/64) para cada uno. El patrón de resistencia para estas últimas 4 ST no se encuentra detallado en bibliografía, sin embargo, en el estudio se observó que ST66 y ST2648 fueron sensibles, ST427 fue BLEE y ST562 fue CRE.

ST70 y ST629 estuvieron presentes en un 6,3% (4/64) cada una. El Instituto Pasteur (2018) las categoriza como cepas CRE y BLEE, respectivamente. Sin embargo, en el estudio, se vio diversidad de patrones de resistencia entre los aislados de estas ST.

ST15 presenta un patrón de resistencia BLEE (Institut Pasteur, 2018) y está ligada a infecciones pulmonares y disfunción renal (Wang et al., 2013). En el presente estudio, ST15 fue observada en un 4,7% (3/64) y todos fueron BLEE. ST15 ha sido reportada como un clon internacional multiresistente miembro del complejo clonal 23. Se ha encontrado que esta ST se disemina en el medio hospitalario a través de las manos del personal y de instrumentos contaminados (Markovska et al., 2015).

STNA2 y ST129 formaron un complejo clonal diferenciado en su locus *tonB*, lo que indica que estas cepas mantienen una estrecha relación biológica funcional y se considera que están evolutivamente relacionadas, además ambas ST fueron sensibles.

ST25 y ST380 conformaron un grupo clonal diferenciado por sus loci *phoE* y *tonB*, sus patrones de resistencia correspondieron a cepas BLEE/CRE y sensibles, respectivamente. Según Satán y Tamayo (2016), ST25 corresponde a bacterias aisladas de infecciones sistémicas en humanos, tal como fue la obtención de todos los aislados estudiados.

STNA1 y ST641 conformaron el último grupo clonal, difieren en dos de sus loci, *mdh* y *phoE*, sin embargo, ambas ST fueron sensibles.

Se identificó que la ST138 de las muestras M31 y M32 presentaron una inserción de 6 bases nitrogenadas en el gen *tonB*. Ambas secuencias fueron caracterizadas como sensibles.

ST307 fue encontrada en 3,1% (2/64) de los aislados. Según el Instituto Pasteur (2018), esta ST puede ser BLEE o CRE, similar al patrón BLEE/CRE encontrado para un aislado, e igual a BLEE para el segundo aislado de esta ST. Para el resto de secuencias tipo no se encontró reportado un patrón de resistencia con el cual comparar.

Se encontraron 3 ST nuevas entre los aislados analizados. STNA1 de los aislados M01 y M04, STNA2 del aislado M15, y STNA3 del aislado M58, lo que indica que la base de datos BIGSdb para *Klebsiella pneumoniae* va aumentando sus ST conforme el tiempo y la evolución de las bacterias (Wang et al., 2013).

Otro objetivo importante de la técnica de MLST es concluir si las bacterias analizadas provienen de infecciones individuales o constituyen un brote (Diancourt et al., 2005). Como vigilancia de las infecciones nosocomiales, es importante que la población bacteriana presente heterogeneidad genética con el fin de descartar posibles brotes (De Souza Lopes, Falcão Rodrigues,

& De Morais, 2005). Se pudo observar que a pesar de que los aislados clínicos en su mayoría fueron BLEE y CRE no constituyeron un brote, pues sus características genotípicas mostraron diversidad, por lo tanto, es un caso de bacterias aisladas de infecciones individuales.

La técnica más utilizada para establecer relaciones entre unidades operativas taxonómicas (OTU), conocidas en este estudio como cepas provenientes de hemocultivos, son el análisis de agrupamiento o formación de dendrogramas (Peña, 2005).

Se realizó un diagrama de red dividido (SN) debido a que el árbol filogenético de máxima verosimilitud (MLT) no representa la totalidad de la historia filogenética de los aislados pues solo toma en consideración eventos mutacionales. Un diagrama de red puede incluir una representación de eventos de transferencia de genes, recombinación, duplicación o hibridación mediante la formación de mallas entre las aristas (Huson & Bryant, 2006). Se puede decir que la población ha sufrido eventos de recombinación debido a que en el diagrama SN se observa una malla que conecta a los aislados (Brisse et al., 2009).

Se puede observar que eBURST generó complejos y grupos clonales que son fácilmente identificables al realizar el árbol de mínima expansión (MSTree), sin embargo, al analizar los arboles de máxima verosimilitud (MLT) y red dividida (SN), se puede observar que no todos los grupos y complejos generados llevan una estrecha relación, específicamente para los grupos clonales GC1 y GC2. Esto se debe a que MSTree utiliza como dato de entrada el perfil alélico y genera un árbol que representa la evolución con el mínimo de eventos posibles, mientras que MLT y SN utilizan la secuencia concatenada de bases nitrogenadas, por ende, cada árbol lleva un diferente tipo de remuestreo lo que afecta su topología (Applied Maths, 2016). Además, SN toma en cuenta todas las posibles relaciones entre las secuencias identificando que únicamente ST427, ST2648 pertenece al GC1 y que el GC2 no presenta una estrecha relación. Este análisis concuerda

con lo mencionado por Feil, et al. (2004) quienes afirman que los grupos y complejos clonales pueden ser de 5/6 o 6/7 loci similares, respectivamente, pero solo los grupos clonales podrán o no tener relación evolutiva mientras que todos los complejos clonales si la tendrán. Brisse, et al. (2009), además indican que el análisis de perfiles alélicos puede ser engañoso y puede dar lugar a agrupaciones de ST no relacionadas.

La secuencia concatenada de los 7 loci tuvo una longitud de 3012 pares de bases, a excepción de la secuencia de las muestras M31 y M32 que tuvieron 3018 pares de bases y cuya ST fue la 138, es decir, 6pb extras en el gen *tonB*. Por ello, ST138 formó un linaje diferente a la mayoría. De igual forma, las STNA1 y ST641 de las muestras M01, M04 y M44 constituyeron otro linaje debido a la cantidad de variaciones en su secuencia nucleotídica comparada con el resto de secuencias.

Se logró observar que en conjunto los datos no permiten determinar una clara correspondencia con el patrón de resistencia de cada perfil alélico pues las muestras, a pesar de presentar un perfil alélico similar, no concuerdan con el patrón de resistencia. Sin embargo, en observaciones individuales de los aislados se puede decir que los aislados ST15 están estrechamente relacionados con el patrón de resistencia BLEE, mientras que el patrón de resistencia CRE estuvo ligado a los aislados ST258 y que finalmente el CC2 y GC3 fueron sensibles. A pesar de haberse encontrado concordancia en el análisis genotipo-fenotipo, es importante recalcar que el genotipo de un aislado no siempre corresponderá al fenotipo que este manifieste, debido a que cada bacteria puede exhibir diferentes características de virulencia o resistencia a fármacos dependiendo del ambiente en el que se desarrolle (Guo et al., 2015).

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Los sistemas de MLST para cada uno de los genes constitutivos de *Klebsiella pneumoniae* fueron optimizados en la amplificación de los fragmentos de PCR mediante el uso de 1U/ μ L de GoTaq Polimerasa para los genes *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi* y de 1U/ μ L de Taq Polimerasa Recombinante para *rpoB*.

En el proceso de secuenciación Sanger, los sistemas fueron optimizados en la fase de secuenciación cíclica utilizando 2 μ L/reacción de BigDye Terminator v3.1 para los genes *gapA*, *mdh*, *infB*, *tonB*, *phoE* y *pgi* y 0,5 μ L de BigDye Terminator v3.1 para *rpoB*, además de la modificación de la temperatura de annealing de 50°C a 60°C para este último gen.

La tipificación de *Klebsiella pneumoniae* se llevó a cabo mediante la Secuenciación Sanger y la técnica de MLST guiándose en la base de datos en línea BIGSdb.

Las herramientas bioinformáticas utilizadas en el presente trabajo de investigación fueron Primer Blast para la determinación del tamaño de cada gen constitutivo; Data Analysis y SeqScanner de Applied Biosystem para el análisis preliminar; Sequencher para la curación de secuencias; BLAST para establecer relaciones entre las secuencias obtenidas y las de referencia; BioNumerics para la curación de secuencias, identificación de números alélicos y secuencias tipo y para la construcción del árbol de mínima expansión; eBURST para la identificación de grupos clonales; MEGA7 para la formación del árbol de máxima verosimilitud y SlipTree para la elaboración de la red dividida en los 64 aislados clínicos analizados.

Se determinaron los perfiles alélicos de los 64 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, provenientes de infecciones sistémicas de los hospitales Carlos Andrade Marín y Eugenio Espejo,

de los cuales se identificaron 25 secuencias tipo reportadas y 3 secuencias tipo no reportadas que fueron agrupadas en 2 complejos clonales, 3 grupos clonales y 15 singletons, pero tras el análisis filogenético se pudo deducir que únicamente existen 2 complejos clonales y un grupo clonal.

La caracterización genotípica de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* y su correspondiente identificación fenotípica, permitió determinar que ST258 con patrón de resistencia CRE y ST39 con patrones de resistencia BLEE y CRE son los clones prevalentes con un 17,18% (11/64) y 15,62% (10/64) de aislados clínicos analizados, respectivamente.

La relación genotipo fenotipo determinó que el CC2 (STNA2 y ST129) y el GC3 (STNA1 y ST641) correspondieron a aislados susceptibles, mientras que ST15 correspondió a patrón BLEE y todos aislados clínicos de la ST258 a patrón CRE.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Reportar los tres perfiles alélicos nuevos para obtener los números de identificación respectivos de cada secuencia tipo.

Realizar un análisis de epidemiología temporal para observar comportamiento de la población bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* en el tiempo y sustentarlo con pruebas de genética poblacional.

Relacionar los aspectos clínico epidemiológico con las caracterizaciones genotípica y fenotípica, con el fin de entender el mecanismo de propagación de los aislados clínicos.

Relacionar la técnica de Análisis de Multilocus – Número Variable de Repeticiones en Tandem (MLVA) con la técnica de MLST.

BIBLIOGRAFÍA

- Aanensen, D. M., & Spratt, B. G. (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, 33(2), 728–733. <https://doi.org/10.1093/nar/gki415>
- Albertí, S. (2004). *Klebsiella, una bacteria que aprovecha las uniones celulares para introducirse en la corriente sanguínea*. España. Retrieved from http://www.uib.cat/digitalAssets/128/128119_neumonia.pdf
- Applied Biosystems. (2004). BigDye® Terminator v3.1/ Sequencing Standard Kit.
- Applied Biosystems. (2007). BigDye® XTerminator™ Purification Kit Protocol. [https://doi.org/Part Number 4374408 Rev. C](https://doi.org/Part%20Number%204374408%20Rev.%20C)
- Applied Biosystems. DNA sequencing by capillary electrophoresis (2009). [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(99\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(99)00041-X)
- Applied Biosystems. (2016). BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit - User Guide. https://doi.org/10.1007/SpringerReference_27988
- Applied Maths. (2016). BioNumerics Seven: a unique software platform. Retrieved February 27, 2018, from <http://www.applied-maths.com/bionumerics>
- Aznar, J., Díaz, J., Mariscal, E., Leva, R., Luengo, L., & De Mier, A. (2009). *Origen Y Evolucion*. CIDEAD-INTEF, España.
- Balarezo, L. (2014). *Caracterización Molecular de Klebsiella pneumoniae Mediante Tipificación por Secuencias de Locus Múltiples (MLST) en Aislados Clínicos del Hospital Carlos*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., & Robledo, C. (2008). *Manual del Usuario-InfoStat*. Córdoba-Argentina: Brujas.
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., & Grimont,

- P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS ONE*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
- Carrigo, J. A., Sabat, A. J., Friedrich, A. W., & Ramirez, M. (2013). Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Euro Surveillance*, 18(4), 1–9. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1.Research>
- Christian, N. A., Roye-Green, K., & Smikle, M. (2010). Molecular epidemiology of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at a Jamaican hospital, 2000 - 2004. *BMC Microbiology*, 10, 2–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-27>
- Córdova, E., Lespada, M. I., Gómez, N., Pasterán, F., Oviedo, V., & Rodríguez-Ismael, C. (2012). Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(7), 376–379. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.12.003>
- Cuadras, C. M. (2018). *Nuevos Métodos De Análisis Multivariante*. (CMC, Ed.). Barcelona-España.
- De Souza Lopes, A. C., Falcão Rodrigues, J., & De Moraes, M. A. (2005). Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. *Microbiological Research*, 160(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.007>
- Derakhshan, S., Najar-Peerayeh, S., & Bakhshi, B. (2017). Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Klebsiella pneumoniae* : Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Microbial Drug Resistance*, 23(5), 626–632. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0107>

- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Patrick, a D., Grimont, P. a D., & Brisse, S. (2005). Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(8), 4178–4182. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178>
- Durdu, B., Hakyemez, I. N., Bolukcu, S., Okay, G., Gultepe, B., & Aslan, T. (2016). Mortality markers in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection Background. *SpringerPlus*, *5*. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3580-8>
- Escobar, C. S., Tapia, J. H., Gavilanes, M., Carlos, H., & Marín, A. (2014). Vigilancia Microbiológica en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital “ Carlos Andrade Marín ” durante el Primer Semestre del 2013. *Revista Médica HJCA*, *6*(2), 133–138. <https://doi.org/10.14410/2014.6.2.010.ABSTRACT>
- Fariñas, M. C., & Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *31*(6), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.016>
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., & Spratt, B. G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, *186*(5), 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>
- Gallardo, J. Á. (2014). Métodos jerárquicos de análisis de cluster. *Métodos Jerárquicos de Análisis Multivariante*, 1–26. Retrieved from <http://www.ugr.es/~gallardo/pdf/cluster-3.pdf>
- GATC Biotech. (2018). SANGER SECUENCING. Retrieved January 30, 2018, from <https://www.gatc-biotech.com/en/expertise/sanger-sequencing.html>
- Guevara, T. (2015). *Estudio retrospectivo de la situación de resistencia bacteriana frente a los*

- antibioticos en el Hospital de Especialidades Eugenio Espejo para el año 2013*. Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6361/1/T-UCE-0008-078.pdf>
- Guo, C., Yang, X., Wu, Y., Yang, H., Han, Y., Yang, R., ... Zhou, D. (2015). MLST-based inference of genetic diversity and population structure of clinical *Klebsiella pneumoniae*, China. *Scientific Reports*, 5, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep07612>
- Hall, B., & Hallfrimsson, B. (2008). Changes in Gene Frequencies. In *Strickberger's Evolution* (4th ed., pp. 560–580). Londres-Reino Unido. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=jrDD3cyA09kC&pg=PA552&lpg=PA552&dq=equilibrium+strickberger+1985&source=bl&ots=8CR2nIZMfk&sig=wz-n_LMpyBd1BSr6kfOc6RtlRSo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjN5KvvrMTZAhWotlkKHZapBSOQ6AEILzAB#v=onepage&q=equilibrium%2520strickberge
- Hernández, J. R., Martínez, L., Cantón, R., Coque, T., & Pascual, A. (2005). Nationwide Study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2122–2125. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2122>
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Instituto Pasteur. (2018). *Klebsiella Sequence Typing Home Page*. Retrieved January 24, 2018, from <http://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>
- Invitrogen. (2016). Taq DNA Polimerase , recombinante.
- Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A., & Maldonado, L. (2012). *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa tipo KPC: Primer Reporte en el Ecuador. *Revista*

de La Facultad de Ciencias Médicas, 37(October), 39–42.

- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–30. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>
- Liu, P., Li, P., Jiang, X., Bi, D., Xie, Y., Tai, C., Ou, H. (2012). Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp . *pneumoniae* HS11286 , a Multidrug-Resistant Strain Isolated from. *Journal of Bacteriology*, 194(7), 1841–1842. <https://doi.org/10.1128/JB.00043-12>
- Markovska, R., Stoeva, T., Schneider, I., Boyanova, L., Popova, V., Dacheva, D., Mitov, I. (2015). Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *Apmis*, 123(10), 887–894. <https://doi.org/10.1111/apm.12433>
- Martin, R. M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., ... Bachman, M. A. (2016). Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *American Society for Microbiology*, 1(5), 261–271. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00261-16>
- Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. *Rev. Otorrinolaringología*, 69(2), 185–192. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2016). Enterobacterales. In *Medical Microbiology* (8th ed., pp. 251–264). Canada: Elsevier.
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que*

- se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. WHO. World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- Organización Panamericana de la Salud. (2015). Antimicrobial Resistance - Statistics and Maps. Retrieved February 21, 2018, from http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=4106&Itemid=40740&lang=en
- Paczosa, M. K., & Meccas, 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>
- Peña, D. (2005). *Estudio de la Diversidad Genética de Caricaceas en el sur del país mediante marcadores RAPD*. Universidad de Guayaquil. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=934zAQAAMAAJ&pg=PA22&lpg=PA22&dq=matriz+de+coeficientes+de+similitud+UPGMA&source=bl&ots=bb2U05Eqyk&sig=EXjLtJVfAklaeUQW9YCOmyMNUto&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwifPVrajZAhVC21MKHUDGAcMQ6AEIYTAJ#v=onepage&q=matriz de coe>
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 38–53. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009>
- Perez, M., Porter, M., Viscidi, P., & Crandall, K. (2011). Multilocus Sequence Typing of Pathogens. In M. Tibayrenc (Ed.), *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* (pp. 507–521). United States of America: Elsevier.
- Pinheiro, V. B., Ong, J. L., & Holliger, P. (2012). *Polymerase engineering: from PCR and sequencing to synthetic biology*. *Protein Engineering Handbook* (Vol. 3).

- Pírez, M., & Mota, M. (2008). Morfología y estructura bacteriana. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589–603.
- Promega. (2016). GoTaq Flexi DNA Polymerase.
- Puerta, E. A., & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, *10*(51), 3426–3431. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
- Richter, M., & Rossello-Mora, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(45), 19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
- Ridley, M. (2004). Evolutionary Genetics. In *Evolution* (pp. 93–252). Australia: Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6133-5>
- Rodríguez, J., Navarro, M. D., Romero, L., Martínez, L., Muniain, M. A., Perea, E., Pascual, A. (2004). Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(3), 1089–1094. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1089>
- Satán, C., & Tamayo, R. (2016). *Epidemiología molecular de Klebsiella pneumoniae productora del gen blaKPC, mediante las técnicas de PFGE y MLST, en cepas de muestras invasivas analizadas en el INSPI-Quito en el periodo 2013-2014*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/11413>
- Singh, K. (2013). Genes: Structure, Replication, and Mutation. In *Microbial Molecular Biology*

and Genetic (pp. 227–259).

Sol-Church, K., & Frenck, J. (2014). Sequencing Guidelines. *Biomolecular Core Facility*.

Surzycki, S. (2000). *Basic techniques in molecular biology*. Springer. Retrieved from https://books.google.com.ec/books/about/Basic_Techniques_in_Molecular_Biology.html?id=GS1vQgAACAAJ&redir_esc=y

Tamayo, R., Satán, C., Villavivencio, F., Reyes, J., Cárdenas, P., & Villacis, F. (2016). *Secuencias tipo de Klebsiella pneumoniae-KPC aisladas de muestras invasivas en Hospitales del Ecuador*. Ecuador. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2694.4408>

Wang, Q., Li, B., Tsang, A. K. L., Yi, Y., Woo, P. C. Y., & Liu, C. H. (2013). Genotypic Analysis of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Beijing Hospital Reveals High Genetic Diversity and Clonal Population Structure of Drug-Resistant Isolates. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057091>

Wolfe, K. H., & Li, W.-H. (2003). Molecular evolution meets the genomics revolution. *Nature Genetics*, 33(3s), 255–265. <https://doi.org/10.1038/ng1088>

Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends in Microbiology*, 24(12), 944–956. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.007>

Xu, X., Li, X., Luo, M., Liu, P., Su, K., Qing, Y., ... Li, Y. (2017). Molecular characterisations of integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese tertiary hospital. *Microbial Pathogenesis*, 104, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.035>