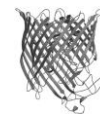
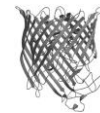


Contenido

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Genero <i>Klebsiella</i>	7
2.1.2. Clasificación.....	8
2.2. Factores De Virulencia.....	9
2.3. Antimicrobianos.....	9
2.4. Mecanismos de resistencia.....	10
2.4.1. Modificación enzimática del antibiótico:	10
2.4.2. β - lactamasas de espectro extendido (BLEE):.....	10
2.4.3. Bombas de expulsión:	11
2.4.4. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:	11
2.4.5. Alteraciones del sitio de acción:.....	12
2.5. Pared celular en bacterias Gram negativas.....	12
2.5.1 Porinas.....	13
3. ESTADO DEL ARTE	15
4. OBJETIVOS.....	18
4.1. General	18
4.2. Específicos.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Cepas de bacterias y cultivo	19
5.2. Identificación bioquímica.....	19

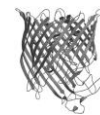


5.3. Pruebas de Susceptibilidad	19
5.4. Extracción de ADN.....	20
5.5. Presencia de los genes <i>OmpK35</i> , <i>OmpK36</i> y <i>OmpK37</i> por PCR.....	20
5.6. Extracción de la fracción de membrana externa y perfil de porinas	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1. Identificación de especies.....	22
6.2. Pruebas de Susceptibilidad	23
6.3. Presencia de los genes <i>OmpK35</i> , <i>OmpK36</i> y <i>OmpK37</i> por PCR.....	27
6.4. Perfil de porinas.....	28
7. CONCLUSIONES.....	33
8. RECOMENDACIONES.....	34
9. BIBLIOGRAFÍA.....	35
10. ANEXOS.....	41
10.1. Anexo 1. Aislamiento del ADN genómico.	41
10.2. Anexo 2. Extracción de proteínas de membrana externa.....	42



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> . A la derecha cultivo sobre agar MacConkey. A la izquierda la estructura morfológica por microscopía electrónica. (Tomado de Umeh <i>et al.</i> , 2009).....	8
Figura 2. Pared celular de bacterias gram negativas (tomado de Scatamburlo <i>et al.</i> , 2004).....	14
Figura 3. Modelo estructural de un monómero de OmpK36 (tomado de Albertí <i>et al.</i> , 1995).....	15
Figura 4. Prueba de sensibilidad por difusión de disco para la cepa N° 12 en agar Mueller Hilton.....	25
Figura 5. Concentración inhibitoria mínima para la cepa N° 12 en medio LB suplementado con las máximas concentraciones de cada antibiótico. A: CAZ, >256; B: CZ, >256; C: CTX, >512; D: CF, >256; E: CXM, >256; F: ATM, >256.....	26
Figura 6. Amplificación por PCR del gen <i>OmpK36</i> en cepas resistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Pb: marcador de peso molecular en pares de bases, 4-28: cepas resistentes, Ref: cepa de referencia ATCC 13883.....	28
Figura 7. Amplificación por PCR del gen <i>OmpK35</i> en cepas resistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . 4-28: cepas resistentes, Ref: cepa de referencia ATCC 13883.....	28
Figura 8. Perfil de PME en SDS-PAGE al 10% de aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . kDa: marcador de peso molecular en Kilodaltones. 4-28: cepas resistentes, Ref: cepa de referencia ATCC 13883, 13-26: cepas sensibles.....	29

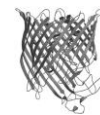


LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación bioquímica de aislados clínicos mediante pruebas estándares...23
Tabla 2. Perfil fenotípico de resistencia de aislados identificados como <i>Klebsiella pneumoniae</i> por el método de sensibilidad por difusión en disco.....24
Tabla 3. Concentraciones inhibitorias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de aislados resistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i>26
Tabla 4. Diferentes fenotipos encontrados en las cepas resistentes de <i>Klebsiella</i> 27
Tabla 5. Perfil de porinas asociado a los perfiles de resistencia en los aislados de resistentes de <i>Klebsiella</i>29

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Aislamiento del ADN genómico.....41
Anexo 2. Extracción de proteínas de membrana externa.....42



RESUMEN

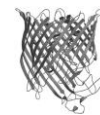
Las bacterias del género *Klebsiella* son una causa frecuente de infecciones nosocomiales. Uno de los principales factores de virulencia son las proteínas de membrana externa. Se ha descrito previamente que *Klebsiella pneumoniae* sintetiza dos porinas mayores, OmpK35 y OmpK36 y una porina quiescente OmpK37. OmpK35 permite una penetración más eficiente de cefalosporinas que OmpK36. Este es el primer informe en Colombia en el que se caracterizan molecularmente aislados *klebsiella* por expresión de porinas y su asociación a la resistencia a antimicrobiales. De 37 aislados clínicos provenientes de la clínica central de Armenia, 25 fueron identificados como *Klebsiella pneumoniae* y 3 como *Klebsiella oxytoca*. Su nivel de susceptibilidad se evaluó por el método de sensibilidad por difusión en disco con 11 antimicrobianos para discriminar cepas resistentes. Se determinó la concentración mínima inhibitoria para las cepas resistentes con todos los antibióticos por la técnica de difusión en caldo. Las proteínas de membrana externa fueron aisladas de las cepas resistentes, su presencia o ausencia se determinó por SDS-PAGE. Se encontraron ocho fenotipos diferentes de resistencia, todos los aislados sensibles presentaron las porinas OmpK35 y OmpK36, dos de los nueve aislados resistentes que expresaron las dos porinas, OmpK35 y OmpK36, presentaron el menor número de resistencias. Se observó relación entre la ausencia de expresión de OmpK35 y la resistencia a ceftazidima, cefazolina, cefuroxima, aztreonam y gentamicina., OmpK36 no influyó en las resistencias encontradas ni en decrementos de CIM. El único aislado resistente a ciprofloxacina fue *Klebsiella oxytoca*.

Palabras claves: *Klebsiella pneumoniae*, membrana externa, porinas, antibiótico-resistencia.

ABSTRACT

The bacteria of the genus *Klebsiella* is a common cause of nosocomial infections. One of the main virulence factors are outer membrane proteins. Has been reported previously that *Klebsiella pneumoniae* synthesizes two major porins, OmpK35 and OmpK36 and a quiescent porin OmpK37. OmpK35 allows more efficient penetration cephalosporins than OmpK36. This is the first report on Colombia in molecularly characterized *Klebsiella* isolated by expression of porins and its association with antimicrobial resistance. Of 37 inmates from the clinical trials center of Armenia, 25 were identified as *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* and 3. Its level susceptibility was evaluated by the method of sensitivity by disk diffusion with 11 antimicrobial to discriminate resistant strains. We determined the minimum inhibitory concentration for strains resistant to all antibiotics by the diffusion technique in broth. The outer membrane proteins were isolated from the resistant strains, its presence or absence was determined by SDS-PAGE. He found eight different resistance phenotypes, all isolates susceptible showed OmpK35 and OmpK36 porins, two of the nine resistant isolates that expressed the two porins, OmpK35 and OmpK36, showed the lowest number of resistance. Relationship was observed between the absence of OmpK35 expression and resistance to ceftazidime, cefazolin, cefuroxime, aztreonam and gentamicin. OmpK36 did not influence the resistance encountered or decreases in CIM. The only resistance to ciprofloxacin was isolated from *Klebsiella oxytoca*.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, out membran protein, porin, antimicrobial resistance

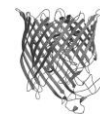


1. INTRODUCCIÓN

Las especies del genero *Klebsiella* son inmóviles, gram-negativas, anaerobias facultativas y con una prominente cápsula de polisacáridos, este genero es ubicuo en la naturaleza. *Klebsiella* tienen dos hábitats comunes, uno de ellos es el medio ambiente, donde se encuentran en aguas superficiales, aguas residuales, suelo y plantas; y el otro son las superficies de las mucosas de mamíferos que hayan colonizado (Brown *et al.*, 1973). La especie *Klebsiella pneumoniae* es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los individuos ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Podschun *et al.*, 1998).

Uno de los principales factores de virulencia son las proteínas de membrana externa (**PME**). Las PME desempeñan papeles importantes en variedad de funciones; en primer lugar estas sirven como una barrera de difusión para solutos extracelulares e interacción con ambientes externos (Nikaido, 1994), se ha descrito que la superficie bacteriana juega un papel importante en la susceptibilidad a suero humano o animal, normal o inmune (Martínez-Ramos *et al.*, 2001). Las PME se destacan por su importancia en el proceso de resistencia a antibióticos beta-lactámicos normalmente usados para tratar infecciones con *Klebsiella*, se ha observado decrecimiento de susceptibilidad a cefamicina en mutantes deficientes de porinas y resistencia a cefoxitina y moxalactam, también se ha observado altas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) con meropenem, cefotaxima, cefepima, ciprofloxacim, imipenem y aztreonam (Skopková-Zarnayova *et al.*, 2005).

Los estudios de *Klebsiella pneumoniae* en Colombia se han dirigido principalmente a la caracterización del perfil de resistencia, en especial a los Beta-lactámicos, lo que hace necesario centrar la atención en el conocimiento de los factores que han favorecido el desarrollo de estas resistencias, los mecanismos moleculares y de la expresión de proteínas determinantes de la susceptibilidad en cada población bacteriana, lo que justifica la realización de este trabajo, en el cual se busco identificar la relación entre la expresión de proteínas porinas y la resistencia a antimicrobianos por impermeabilidad en varios fenotipos resistentes de *Klebsiella*.



2. MARCO TEÓRICO

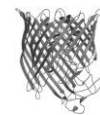
2.1. Genero *Klebsiella*

Este genero, *Klebsiella*, fue llamado así en honor de Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de fines del siglo XIX. Los bacilos ahora conocidos como *Klebsiella* también fueron descritos por Carl Friedlander, y por muchos años el bacilo de Friedlander fue también conocido como causa de neumonías severas y en ocasiones fatales.

K. pneumoniae es la especie tipo de este genero. Debe sospecharse la presencia de especies de *Klebsiella* cuando se recuperan colonias grandes de consistencia mucosa en placas de aislamiento primario como es el agar nutritivo. Sobre agar MacConkey, típicamente aparecen como colonias grandes, mucoides y rojas, con pigmento rojo usualmente difusible en el agar circundante (Fig. 1), lo que indica fermentación de la lactosa, sin embargo no todas las cepas son mucosas y ciertas especies de *Enterobacter* pueden ser muy similares a especies de *Klebsiella* en las pruebas de identificación. Todas las especies de *Klebsiella* son inmóviles y la mayoría no descarboxilan la ornitina, (*K. ornithinolytica* es ornitina positiva) características que son positivas para la mayoría de especies de *Enterobacter*. Son anaerobias facultativas y con una prominente cápsula de polisacáridos. En la tinción de Gram son negativos; la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el medio Kligler, donde son positivos y desprenden gas; y en la fermentación acetónica o prueba de Voges Proskauer son positivos (Koneman *et al.*, 2001).



Figura 1. *Klebsiella pneumoniae*. A la derecha cultivo sobre agar MacConkey. A la izquierda la estructura morfológica por microscopía electrónica. (Tomado de Umeh *et al.*, 2009).



Klebsiella pneumoniae, dentro de este género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus o alcohólicos. A día de hoy también existe una fuerte teoría que la relaciona con la Espondilitis Anquilosante.

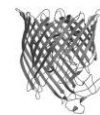
Causa alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales en pacientes debilitados que puede terminar con la vida del paciente. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema. (Mendes *et al.*, 2004)

2.1.2. Clasificación

Este género pertenece a la clase Gamma Proteobacteria, orden: Enterobacteriales, familia: Enterobacteriaceae.

El género *Klebsiella* comprende 10 especies (NCBI, 2009 onward; Martínez *et al.*, 2004):

- *Klebsiella pneumoniae*, que comprende 3 subespecies: *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp *rhinoscleromatis*.
- *Klebsiella oxytoca* con *Klebsiella oxytoca* subsp *M5a*.
- *Klebsiella aerogenes*.
- *Klebsiella alba*.
- *Klebsiella granulomatis*.
- *Klebsiella milletis*.
- *Klebsiella cf. Planticola*.
- *Klebsiella senegalensis*.
- *Klebsiella singaporensis*.
- *Klebsiella variicola*, con *Klebsiella variicola* subsp *At-22*.



2.2. Factores De Virulencia

Todos los miembros de *Enterobacteriaceae* son capaces de elaborar una capa de polisacáridos asociado a la superficie llamada capsula. La composición de estos polisacáridos capsulares es dependiente de la cepa (Schembri *et al.*, 2004). La capsula es considerada como la propiedad de virulencia dominante, por lo tanto esta capsula de polisacáridos contribuye a la patogénesis por la resistencia mediada a la fagocitosis y a la muerte por suero (Williams *et al.*, 1983). *K. pneumoniae* produce un numero de factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis, incluyendo adhesinas fimbriales, sideroforos, antígenos O, y antígenos capsulares. En *K. pneumoniae*, como mínimo 77 polisacáridos distintos llamados antígenos K han sido reportados (Bender *et al.*, 1991).

2.3. Antimicrobianos

La mayoría de agentes antimicrobianos usados para el tratamiento de infecciones bacterianas pueden ser categorizados de acuerdo a sus principales mecanismos de acción. Estos son los modos de acción más comunes: interferencia de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas, interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos e inhibición de alguna vía metabólica importante:

Antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular

- Lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactámicos
- Glicopéptidos: vancomicina, teicoplanina

Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

- Unión a la subunidad ribosomal 50S: macrólidos, cloranfenicol, clindamicina.
- Unión a la subunidad ribosomal 30S: aminoglicósidos, tetraciclinas
- Unión a la isoleucina -tRNA sintetasa bacteriana: mupirocina

Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos

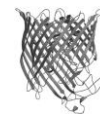
- Inhibición de la síntesis de ADN: fluoroquinolonas
- Inhibición de la síntesis de ARN: rifampicina

Inhibición de vía metabólica

- Sulfonamidas, análogos al ácido fólico

Daño de la estructura membranal bacteriana

- Polimixinas, daptomicina



Los medicamentos antibacterianos que actúan en la inhibición de la síntesis de la pared celular incluyen: los lactámicos tales como la penicilina, cefalosporinas, carbapanemes y monobactámicos y los glicopéptidos, incluyendo vancomicina y teicoplanina (Neu, 1992).

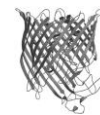
La perturbación de la estructura de la membrana bacteriana puede ser un quinto punto de acción de los antimicrobianos, aunque no es un mecanismo bien caracterizado, se dice que polimixinas ejercen sus efectos inhibitorios mediante el aumento de la permeabilidad de las membranas bacterianas, causando la liberación de todo el contenido bacterial. La daptomicina es un lipopeptido cíclico que aparentemente introduce su cola de lípidos en la membrana de la célula bacteriana causándole una despolarización y la eventual muerte (Tenover, 2006).

2.4. Mecanismos de resistencia

Teniendo en cuenta que las bacterias gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos mecanismos puede llevar a falla terapéutica, es importante conocer sus mecanismos de resistencia más relevantes. Estos mecanismos de resistencia podrían resumirse en cuatro categorías:

2.4.1. Modificación enzimática del antibiótico: Los antibióticos β -lactámicos tienen en común su estructura molecular con un anillo β -lactámico, el cual es responsable en gran parte de su acción antimicrobiana. Las β -lactamasas son enzimas capaces de romper este anillo e inactivar estos antibióticos. Las β -lactamasas son ubicuas de las bacterias gram negativas y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones (Tafur *et al.*, 2008).

2.4.2. β - lactamasas de espectro extendido (BLEE): Las BLEE han sido reportadas en múltiples especies de bacterias Gram negativas. Las especies de *Klebsiella* Y *Escherichia coli* son las más frecuentemente implicadas. Estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefalosporinas (como las cefalosporinas de tercera generación), el aztreonam, las penicilinas y las cefalosporinas de espectro reducido. Por otro lado, son incapaces de hidrolizar cefamicinas (cefotitina y cefotetán) y carbapanemes. Las BLEE

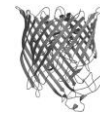


son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Se han descrito varias familias de BLEE, siendo las β -lactamasas Temoneirsa (TEM), β -lactamasas sulfhidril variable (SHV) y cefotaximasas (CTX-M) las más prevalentes y OXA, PER VER, BES Y TOHO las menos frecuentes. La mayoría de BLEE se ha originado por medio de mutaciones espontáneas de β -lactamasas de espectro reducido por cambios en los aminoácidos en su sitio activo, lo que permite ampliar su capacidad hidrolítica (Tafur *et al.*, 2008).

Una característica importante de las BLEE es que son mediadas por plásmidos, lo cual les confiere una increíble capacidad de diseminación entre diferentes especies. Además, en el mismo plásmido que porta los genes de BLEE, pueden encontrarse genes que codifican resistencia para aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual puede contribuir a la resistencia de múltiples antibióticos (Tafur *et al.*, 2008).

2.4.3. Bombas de expulsión: Las bombas de expulsión han sido reconocidas por muchos años y están presentes en cada célula. Su popularidad ha venido en aumento concomitantemente con la creciente evidencia que las implica como responsables de resistencia contra antimicrobianos, no sólo en bacterias, sino también en otros patógenos como los parásitos del género *Plasmodium*, se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de gran cantidad de moléculas, entre ellas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos; para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético. El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula. Las bombas de salida pueden ser específicas para un fármaco (generalmente, codificadas en plásmido y, por lo tanto, transmisibles) o inespecíficas (generalmente expresadas en el cromosoma bacteriano) (Tafur *et al.*, 2008).

2.4.4. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: Las porinas embebidas en la membrana externa de las bacterias gram negativas son canales que trabajan como filtros en una membrana permeable. Además de otras funciones vitales, estas moléculas tienen la capacidad de retardar el acceso de los antibióticos al interior de la bacteria. Los antibióticos β -lactámicos deben penetrar a través de estos canales; cuando se pierde una porina por mutaciones, aumentan las CIM (concentración inhibitoria mínima) para el

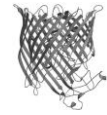


antibiótico. Las porinas pueden ser específicas o inespecíficas dependiendo de su selectividad para las moléculas que dejan pasar (Tafur *et al.*, 2008).

2.4.5. Alteraciones del sitio de acción: El cambio en la estructura terciaria del sitio donde los antibióticos ejercen su acción es el otro mecanismo de resistencia. Los sitios de acción se pueden encontrar en diferentes componentes bacterianos que involucran actividades celulares vitales. En el caso de la síntesis de la pared celular, las proteínas acopladoras de penicilinas son las responsables de la transpeptidación, proceso fundamental para la estabilidad de la pared celular. Todos los β -lactámicos tienen como blanco las proteínas acopladoras de penicilinas, que llevan a la lisis de la pared celular. Las alteraciones estructurales secundarias y mutaciones pueden disminuir la afinidad de los β -lactámicos por las proteínas acopladoras de penicilinas y permiten que la bacteria continúe con su pared indemne y sobreviva. Este mecanismo es el más importante para las bacterias gram positivas, especialmente, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Para las bacterias gram negativas esta estrategia es menos frecuente. Otro sitio de acción de los antibióticos es la síntesis de proteínas. Este proceso puede inhibirse al atacar los componentes nucleares de la transcripción del ARN. Por ejemplo, las quinolonas inhiben la topoisomerasa, enzima encargada del desdoblamiento del ADN para su replicación. Asimismo, la síntesis de proteínas, llevada a cabo en los ribosomas, puede ser inhibida por fármacos como los aminoglucósidos, las tetraciclinas, la clindamicina, los macrólidos y el cloranfenicol. Usualmente se debe a alteraciones cromosómicas aunque recientemente se ha asociado a genes transmitidos por plásmidos. En Colombia existen tasas de resistencia a ciprofloxacina en *E. coli* de alrededor de 50%, lo cual se encuentra muy por encima de lo reportado en los Estados Unidos; los mecanismos causantes aún no se han elucidado (Tafur *et al.*, 2008).

2.5. Pared celular en bacterias Gram negativas

Las Bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana celular interna la cual se rodea por una pared celular delgada de peptidoglicano y, hacia el lado externo del cuerpo de la célula una membrana celular externa que recubre la pared celular en estas bacterias (Fig 2). Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa está el espacio periplásmico el cual presenta una sustancia llamada



periplasma la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias. La membrana externa presenta una estructura llamada lipopolisacárido (LPS) y tiene diversas proteínas, siendo una de ellas las proteínas llamadas porinas o canales proteicos. El LPS está formado por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina) (Nikaido *et al.*, 1985).

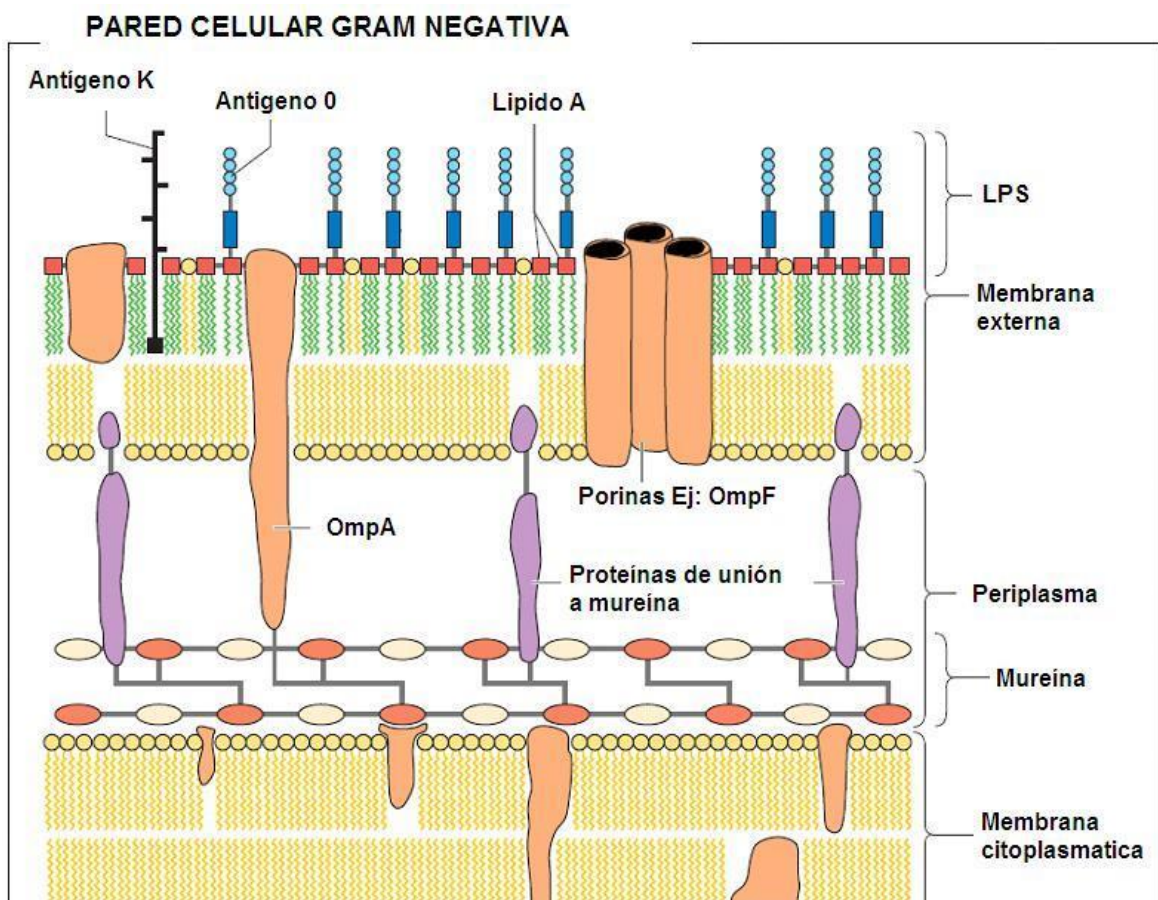
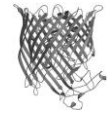


Figura 2. Pared celular de bacterias gram negativas (tomado de Scatamburlo *et al.*, 2004).

2.5.1 Porinas

Las porinas son los poros de las mitocondrias o VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), que permiten el paso de moléculas de hasta 10 kD y un diámetro aproximado de 20 Å. Las porinas encontradas en bacterias Gram negativas tienen una gran importancia. Permiten el paso de determinadas sustancias requeridas por estas bacterias así como la salida de productos de desecho y determinadas sustancias dañinas para las bacterias



como los antibióticos. La estructura general de estas proteínas la forman trímeros asociados (Koebnik *et al.*, 2000).

Klebsiella pneumoniae sintetiza dos porinas mayores, OmpK35 y OmpK36 (Fig. 3) y una porina quiescente OmpK37, OmpK35 es homologa a OmpF de *Escherichia coli*, su expresión ha sido reducida bajo altas condiciones de osmolaridad (Doménech-Sánchez, 2003) mientras que OmpK36 es homologa a OmpC de *E. coli* (Albertí *et al.*, 1995). La porina Ompk37 es similar a OmpN en *E. coli* y a OmpS2 en *Salmonella typhi*, ambas siendo porinas quiescentes cuyas expresiones en *Enterobacterias* es poco regulada en condiciones estándares de laboratorio (Domenech-Sanchez, 1999).

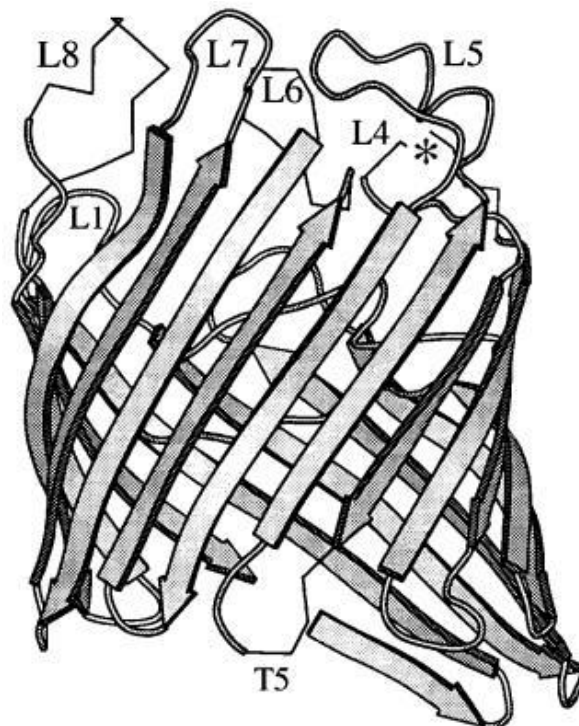
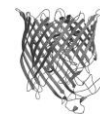


Figura 3. Modelo estructural de un monómero de OmpK36 (tomado de Albertí *et al.*, 1995).



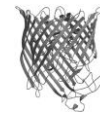
3. ESTADO DEL ARTE

Las porinas de *Escherichia coli* hasta el momento han sido las más caracterizadas en cuanto su bioquímica, funcionalidad, genética, inmunoquímica y propiedades estructurales (Rosenbusch, 1974; Bassford *et al.*, 1977).

Kaneko *et al.*, (1984) identificaron dos porinas en cepas de *Enterobacter cloacae*, en donde describieron su masa molecular, tamaño del poro y selectividad por cargas eléctricas, las llamaron 37kD y 40kD debido a su peso molecular, más tarde estas cepas fueron reidentificadas por Sawai *et al.*, (1987) como *Klebsiella pneumoniae*, en un estudio donde inhibían la síntesis de porinas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* por medio de salicilato en el medio de cultivo.

Posteriormente Albertí *et al.*, (1993) determinaron que estas proteínas son homologas a las porinas de *E. coli* OmpC y OmpF, por medio de sus métodos de extracción, masas moleculares y secuencia de N-terminal, y además en este estudio se demostró que estas porinas pueden formar un complejo con C1q, el primer componente de la ruta clásica del sistema complemento, y que pueden activar la cascada del complemento, una propiedad nunca observada en otras proteínas de membrana externa (PME) o lipopolisacáridos (LPS).

Tres años después, Albertí *et al.*, (1999) caracterizaron muy bien una de las porinas expresadas en *K. pneumoniae* en el trabajo titulado "A Porin from *Klebsiella pneumoniae* Sequence Homology, Three-Dimensional Model, and Complement Binding", determinaron su peso por medio de migración en electroforesis de poliacrilamida con una movilidad correspondiente a 36 kDa, debido a esto la llamaron OmpK36. La secuencia del gen reveló que OmpK36 es pariente cercano a la familia de porinas *Enterobacteriales*, con un alto grado de homología con las porinas de *E. coli* OmpC, PhoE, y OmpF. En base a la estructura tridimensional de estas porinas y usando análisis por rayos-x, se modeló la estructura de OmpK36 y se encontró que igual que sus proteínas homologas, también cuenta con un motivo B-barril de 16- stranded y largos bucles en un extremo y cortos giros en el otro, en cuanto a la unión a componente C1q del complemento, el modelo sugiere que el sitio de unión a C1q están cubiertos por LPS en la porina nativa.

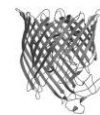


Luis Martínez Martínez *et al.*, (1996) evaluaron aislados de *K. pneumoniae*, los cuales presentaban resistencia a cefalosporinas de espectro extendido y cefoxitina, pero solo se presento alta resistencia a cefoxitina en los aislados que carecían de la porina OmpK35 y producían la enzima SHV-5, estos resultados fueron revertidos cuando estas cepas carentes de OmpK35 fueron transformados con un gen que codificaba para la porina OmpK36, concluyendo así que la resistencia a cefoxitina y cefalosporinas de espectro extendido es debido a la perdida de porinas para el paso del antibiótico.

Ardanuy *et al.*, (1999), estudiaron quince aislados clínicos productores de Beta-Lactamasas de espectro extendido (BLEE) de un brote nosocomial. Todos los aislados fueron resistentes a cefalosporinas de amplio espectro, aztreonam, gentamicina y fluoroquinolonas y fueron sensibles a los carbapenémicos, tobramicina, netilmicina y amikacina, ninguno expresó la porina OmpK36, la CIM de meropenem, cefotaxima y cefpiroma fue de tres a ocho veces más alto para aislados que no expresaban la porina OmpK35 ó la expresaban en pocas cantidades, para imipenem la CIM aumento el doble en los aislados que no expresaban esta proteína. Concluyendo que el alto nivel de resistencia a la cefoxitina y el aumento de la CIM de meropenem, cefotaxima y cefpiroma para los aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de BLEE estudiados están asociados con la deficiencia de porinas.

Una nueva porina fue identificada en *Klebsiella pneumoniae* por Doménech-Sánchez *et al.*, (1999) en donde analizaron por PCR y Southern blot las mutaciones de cepas deficientes de porinas y resistentes a B-Lactámicos, encontrándose un tercer gen en adición a los de las porinas OmpK35 y OmpK36, llamado *OmpK37*, la cual casi no se expresa en condiciones de laboratorio. La caracterización funcional sugirió un poro mas estrecho en comparación con OmpK35 y OmpK36, esto se correlacionó con la susceptibilidad a ciertos antibióticos b-lactámicos, ya que una cepa de *K. pneumoniae* expresa la porina OmpK37 y no la OmpK35 ó OmpK36, era menos susceptible a antibióticos b-lactámicos que las que si expresaban estas dos porinas.

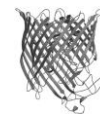
Hernández-Allés *et al.*, (1999) concluyeron que las cepas de *K. pneumoniae* que no expresaban BLEE expresaban las dos porinas, OmpK35 y OmpK36, mientras que las cepas que si expresaban esta enzima solo sintetizaban la porina OmpK36.



Crowley *et al.*, (2002) determinaron que un aislado clínico de *K. pneumoniae* fue resistente a cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, piperacilina-tazobactam, meropenem y fue intermedia a imipenem, se determinó que la resistencia a estos antimicrobianos fue contribuida por la expresión de B-lactamasas SHV-2 y el decrecimiento en la expresión de OmpK36.

La contribución de la resistencia o susceptibilidad a antimicrobianos por la expresión de OmpK35 fue detallada por Doménech-Sánchez *et al.*, (2003), en este estudio se encontró que las cepas de *K. pneumoniae* que carecían de la porina OmpK35, presentaban unas CIM más altas que las cepas carentes de la porina OmpK36, indicando que la porina OmpK35 permite una penetración más eficiente de los antimicrobianos a la bacteria que la porina OmpK36.

Skopková *et al.*, (2005) realizaron un perfil de proteínas de membrana externa de aislados de *K. pneumoniae*, todos los aislados fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación debido a la producción de beta-lactamasa SHV-2 de espectro extendido, la comparación de el perfil de proteínas de membrana externa reveló que un aislado carente de porinas fue también resistente a cefoxitina y moxalactam, y tuvo una elevada CIM. Las elevadas CIMs, asociados con la falta de porinas en la membrana externa, fueron también observadas para cefotaxima, cefepima, ciprofloxacina, imipenem y aztreonam, pero no fueron diferencias significativas entre las CIM de ceftazidima.



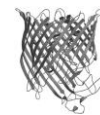
4. OBJETIVOS

4.1. General

Identificar la presencia de porinas asociadas a la disminución de la permeabilidad a antimicrobianos en aislados de *Klebsiella pneumoniae*.

4.2. Específicos

- Identificar especies del genero *Klebsiella* en muestras de individuos con infecciones por bacilos gram-negativos aislados en el laboratorio de microbiología de la Clínica Central del Quindío con identificación presuntiva de *Klebsiella pneumoniae*.
- Realizar el perfil de resistencia y determinar las concentraciones inhibitorias mínimas de los aislados identificados dentro del genero *Klebsiella*.
- Determinar la presencia de los genes que codifican para porinas OmpK en cada uno de los aislados de *Klebsiella* que resulten resistentes.
- Extraer y purificar la fracción celular que contiene las proteínas de la membrana externa.
- Determinar la expresión de porinas en los aislados resistentes de *Klebsiella* utilizando patrones de proteínas de peso conocido y una cepa de *Klebsiella* completamente sensible como control.
- Comparar el perfil de porinas obtenido con los resultados reportados en la literatura a nivel mundial.
- Correlacionar el perfil de porinas con las características fenotípicas de resistencia de las cepas.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas de bacterias y cultivo

Se utilizaron 37 aislados clínicos de bacilos gram-negativos provistos por el laboratorio de la Clínica Central del Quindío entre enero y noviembre del 2007, aislados de tracto respiratorio, heridas quirúrgicas, esputo y muestras orotraqueales, la información de los individuos infectados no estuvo disponible. Las bacterias fueron criopreservadas en 500 μ l de medio Luria Base (LB) y 500 μ l de glicerol conservándose a -80°C tras el aislamiento primario. Como control se utilizó la cepa de referencia *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 suministrada por el grupo de investigación en microbiología de la Universidad Nacional de Colombia.

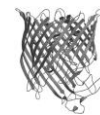
5.2. Identificación bioquímica

La identificación se realizó por medio de metodologías bioquímicas estándares para las pruebas de Indol, Citrato Simmons, Voges Proskauer, Triple Azúcar Hierro, Urea, Movilidad, H₂S, Gas y Rojo de Metilo (Bagley *et al.*, 1978; Merck, 1994)

5.3. Pruebas de Susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron solo en los aislados clínicos identificados como *Klebsiella sp.*, y se realizó utilizando el método de sensibilidad por difusión en disco en medio de cultivo estándar Mueller Hilton, empleando los siguientes antibióticos: Amikacina (AK), Cefazolina (CZ), Cefalotina (CF), Gentamicina (CN), Cefuroxima (CXM), Cefotaxima (CTX), Imipenem (IMI), Ciprofloxacina (CIP), Ceftazidima (CAZ), Aztreonam (ATM), Cloranfenicol (C). El inóculo se preparó a una concentración de $150 \times 10^6/\text{ml}$ según la escala de Mcfarland Estándar (Biomérieux) y se tomaron 500 μ l para realizar la siembra por extendido masivo sobre las cajas de agar.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antibióticos evaluados por el método de sensibilidad por difusión en disco a las cepas que fueron resistentes mínimo a un antibiótico por este método. Se utilizó la técnica de macrodilución en caldo con los antibióticos en estado liofilizado (SIGMA), en medio de cultivo LB con un inóculo de 500 μ l de bacterias a una turbidez de $150 \times 10^6/\text{ml}$ en la escala Mcfarland por cada 5 ml de medio de cultivo enriquecido con las diferentes concentraciones de cada uno de los antibióticos. Utilizando siempre como control en ambas pruebas la cepa de referencia



Klebsiella pneumoniae pneumoniae ATCC/13886, y siguiendo las recomendaciones del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2006), así como la interpretación de los resultados.

5.4. Extracción de ADN

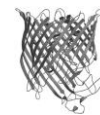
La extracción del ADN cromosomal se llevo a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Van Embden (1998) con algunas modificaciones (Anexo 1).

Para la extracción del ADN plasmídico, las cepas resistentes fueron cultivadas en medio líquido LB e incubadas a 37°C por 18 horas. La extracción se realizo usando el kit Wizard Plus SV minipreps DNA purification System marca Promega.

El ADN fue visualizado por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.0% para el ADN cromosomal, y al 0.8% para el plasmídico, teñidos con bromuro de etidio y corridos a 100 voltios por 40 minutos, y observado bajo un transluminador de luz ultravioleta. La preservación del ADN fue a -20°C

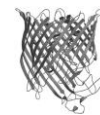
5.5. Presencia de los genes *OmpK35*, *OmpK36* y *OmpK37* por PCR

La amplificación de los genes se llevo a cabo por medio de La reacción en cadena de polimerasa (PCR) para las cepas resistentes con los cebadores propuestos por Doménech-Sánchez *et al.*, (1999) U681 5'-CGGTTACGGCCAGTGGGAATA-3' y L1316 5'-GACGCAGACCGAAATCGAACT-3' para los genes *OmpK35* de 600 pares de bases, y *OmpK36* de 650 pares de bases. L879 5'-CCTGAACGTTGTATTCCCACTG-3' y UP37 5'-CCAAGCTTGACGGAAAACGTCAA-3' para *OmpK37* de 700 pares de bases. La PCR incluyo 5µl de ADN (alrededor 50 ng/µl), 2. µl Buffer de reacción 10X, 5.8 µl de agua, 4µl de dNTPS, 3µl de cada cebador, 2µl de MgCl y 0.2 µl de Taq polimerasa, usando un termociclador TECHNE TC-512. Los ciclos de amplificación constaron de 30 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. Se tomaron las precauciones iniciales que incluyeron controles negativos (Mezcla de PCR sin ADN) para descartar contaminación y asegurar la fidelidad de la reacción. Los productos amplificados fueron visualizados por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.0% teñidos con bromuro de etidio y corridos a 100 voltios por 2 horas; el tamaño de los amplificados fueron estimados comparándolos con los tamaños de los fragmentos del patrón de peso molecular del marcador Hypper ladder II (2Kb, Bioline Corp.).



5.6. Extracción de la fracción de membrana externa y perfil de porinas

Las proteínas de membrana externa (PME) fueron aisladas siguiendo el protocolo de Carlone *et al.*, (1986) (anexo 2), el cual es específico para la extracción de la fracción membrana externa en bacterias gram-negativas; después de dejar crecer el cultivo de bacterias toda la noche. Las muestras de PME extraídas fueron calentadas en baño maría y analizadas en electroforesis en gel de Poliacrilamida al 10% denaturante con SDS (SDS-PAGE) corrido a 60 mA por 3 horas y teñido con azul brillante de coomassie. El tamaño de las proteínas fue estimado comparándolos con los tamaños de los fragmentos del patrón de peso molecular del marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de especies

La mayoría de especies del género *Klebsiella* se caracterizan por presentar colonias grandes amarillas de consistencia mucosa en placas de aislamiento primario, y sobre agar MacConkey aparecen como colonias grandes, mucoides y rojas, con pigmento rojo difusible en el agar circundante, lo que indica fermentación de la lactosa y producción de ácido (Koneman *et al.*, 2006). Sin embargo no todas las especies son mucoides y ciertas especies de *Enterobacter* pueden ser muy similares a especies de *Klebsiella*, por eso es necesario contar con un patrón específico para *Klebsiella* con pruebas bioquímicas.

Entre las enterobacterias, la movilidad nos permite diferenciar el género *Klebsiella*, que es negativo, de las restantes que suelen ser móviles y la prueba de Indol es determinativa para separar *Klebsiella pneumoniae* de *Klebsiella oxytoca*, ya que es negativa para *K. pneumoniae* y positiva para *K. oxytoca*. Así mismo, el género *Klebsiella* es positivo para Citrato Simmons, Triple Azúcar Hierro, Urea y Gas, y negativo para H₂S, las pruebas de Rojo de Metilo y Voges Proskauer, aunque estas pruebas pueden variar entre las especies del género (tabla 1) (Bagley *et al.*, 1978; Koneman *et al.*, 2006),

De 37 aislados clínicos evaluados por las pruebas bioquímicas estándares (Bagley *et al.*, 1978; Merck, 1994; Koneman *et al.*, 2006), se identificaron 24 cepas de la especie *Klebsiella pneumoniae* (tabla 1, barras gris claro) y cuatro de la especie *Klebsiella oxytoca* (tabla 1, barras gris oscuro), las cuales fueron incluidas en el estudio debido a su importancia clínica (Högenauer *et al.*, 2006; Podschun *et al.*, 2001). Se observaron diferentes patrones en las reacciones a las pruebas bioquímicas dentro de la misma especie en *Klebsiella pneumoniae*, debido a que esta especie comprende tres subespecies que son *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *Rhinoscleromatis*, estas tres subespecies no se pudieron identificar debido a la falta de reactivos específicos para realizar las pruebas estándares para este patrón. Las 9 cepas restantes (tabla 1, barras blancas), fueron eliminadas del estudio ya que presentaron reacciones bioquímicas características de otros géneros dentro de la familia *Enterobacteriaceae* como es el género *Enterobacter* (Koneman *et al.*, 2006).

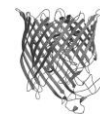


Tabla 1. Identificación bioquímica de aislados clínicos mediante pruebas estándares.

Prueba	cepas																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
Motilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RM	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MOTILIDAD: movilidad; CITRATO: asimilación de citratos, UREA: asimilación de urea; VP: prueba de Voges proskauer; RM: prueba de rojo metilo; INDOL: prueba de indol; TSI: triple azúcar hierro; GAS: producción de dióxido de carbono. H2S: producción de ácido sulfhídrico. Color gris claro: *Klebsiella pneumoniae*. Color gris oscuro: *Klebsiella oxytoca*.

6.2. Pruebas de Susceptibilidad

Por medio de el método de sensibilidad por difusión en disco, se encontró 9 cepas resistentes a los diferentes antibióticos evaluados: la cepa 4 presentó resistencia a Ceftazidima (CAZ), Cefalotina (CF) y Gentamicina (CN); la cepa 6 con resistencia a Cefazolina (CZ), Cefalotina (CF), y Cloranfenicol (C); la cepa 8 a Cefalotina (CF), y Cloranfenicol (C); la cepa 9 a Cefazolina (CZ), Cefalotina (CF), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (CN), la cepa 12 a Ceftazidima (CAZ), Cefazolina (CZ), Cefotaxima (CTX), Cefalotina (CF), Cefuroxima (CXM), y Aztreonam (ATM) (Fig. 4) La cepa numero 18 presento una resistencia intermedia a Cefazolina (CZ), Cefalotina (CF), Aztreonam (ATM) y Gentamicina (CN) y se incluyo en los posteriores análisis ya que presento cuatro resistencias, a diferencia de las cepas 2, 5, 8, 12 y 13 que también presentaron resistencia intermedia, pero solo a uno o dos antibióticos; la cepa 22 con resistencia solo a Cloranfenicol (C); la cepa 23 con resistencia a Cefazolina (CZ), Cefotaxima (CTX), Cefalotina (CF), Cefuroxima (CXM) y Aztreonam (ATM) por ultimo la cepa 28 con resistencia a Ceftazidima (CAZ), Cefazolina (CZ), Cefotaxima (CTX), Cefalotina (CF), Cefuroxima (CXM) y Aztreonam (ATM) (Tabla 2).

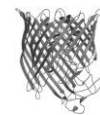


Tabla 2. Perfil fenotípico de resistencia de aislados identificados como *Klebsiella pneumoniae* por el método de sensibilidad por difusión en disco

CEPA	ANTIBIÓTICO										
	CAZ	CZ	CTX	AK	CF	CXM	C	IMI	ATM	CIP	CN
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	S	S	S	R	S	S	S	S	I	R
5	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S
6	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S
9	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	R	R	R	I	R	R	S	S	R	S	S
13	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	S	I	S	S	I	S	S	S	I	S	I
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
23	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
REF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Sensible, R: Resistente; I: intermedia, CAZ: ceftazidima, CZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, AK: amikacina, CF: cefalotina, CXM: cefuroxima, C: cloranfenicol, IMI: imipenem, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, CN: gentamicina, REF: cepa de referencia ATCC 13883 como control negativo. Región sombreada: cepas que presentaron resistencia.

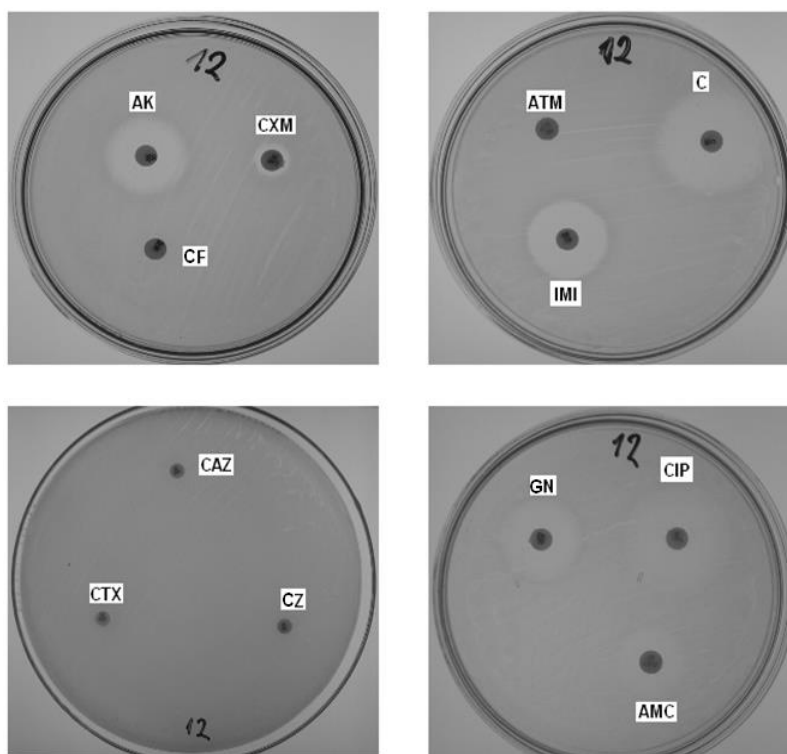
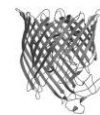


Figura 4. Prueba de sensibilidad por difusión de disco para la cepa N° 12 en agar Mueller Hilton. CAZ: ceftazidima, CZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, AK: amikacina, CF: cefalotina, CXM: cefuroxima, C: cloranfenicol, IMI: imipenem, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, GN: gentamicina.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) observada muestra que las cepas 9, 12, 18, 22, 23 y 28 tienen una resistencia absoluta a la concentración de cada uno de los antibióticos usados (Tabla 3), como se puede observar en la Figura 5 la concentración inhibitoria mínima para la cepa 12 fue independiente tanto de la concentración como de la cantidad de antibiótico, observándose un crecimiento a 256 µg/ml para CAZ, CZ, CF, CXM y ATM y 512 µg/ml para CTX, frente al no crecimiento de la cepa control, lo que indica que la resistencia en esta cepa es de carácter absoluto. Esto puede estar asociado a varios factores como son la inadecuada terapia antibacteriana y el uso de antibióticos genéricos, lo que genera tasas de resistencia cada vez mayores (Tenover, 2006), estos resultados indican que la emergencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antimicrobianos es un problema a la hora de tratar infecciones causadas por ellas (Bradford, 2001; Martínez *et al.*, 2005; Paterson *et al.*, 2005), en Colombia se han reportado niveles de resistencia a cefalosporinas hasta del 44% para esta especie. (Martínez *et al.*, 2005).

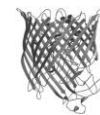


Tabla 3. Concentraciones inhibitorias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) de aislados resistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Cepa	Antibiótico										
	CAZ	CZ	CTX	AK	CF	CXM	C	IMI	ATM	CIP	CN
4	256	32	4	64	256	32	16	4	16	64	128
6	32	128	4	64	>256	16	256	8	64	32	64
8	64	32	16	64	>256	64	256	4	32	32	64
9	32	>256	64	128	>256	64	8	4	64	>64	>128
12	>256	>256	>512	64	>256	>256	64	4	>256	16	32
18	16	>256	16	32	>256	32	64	4	256	32	>128
22	16	8	4	24	32	64	128	2	64	32	64
23	16	>256	>512	32	>256	>256	8	4	>256	32	64
28	>256	>256	512	32	>256	>256	64	4	>256	32	64
Ref	4	64	<1	32	4	32	32	4	64	32	16

CAZ: ceftazidima, CZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, AK: amikacina, CF: cefalotina, CXM: cefuroxima, C: cloranfenicol, IMI: imipenem, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, CN: gentamicina, Ref: cepa de referencia ATCC 13883 como control negativo.

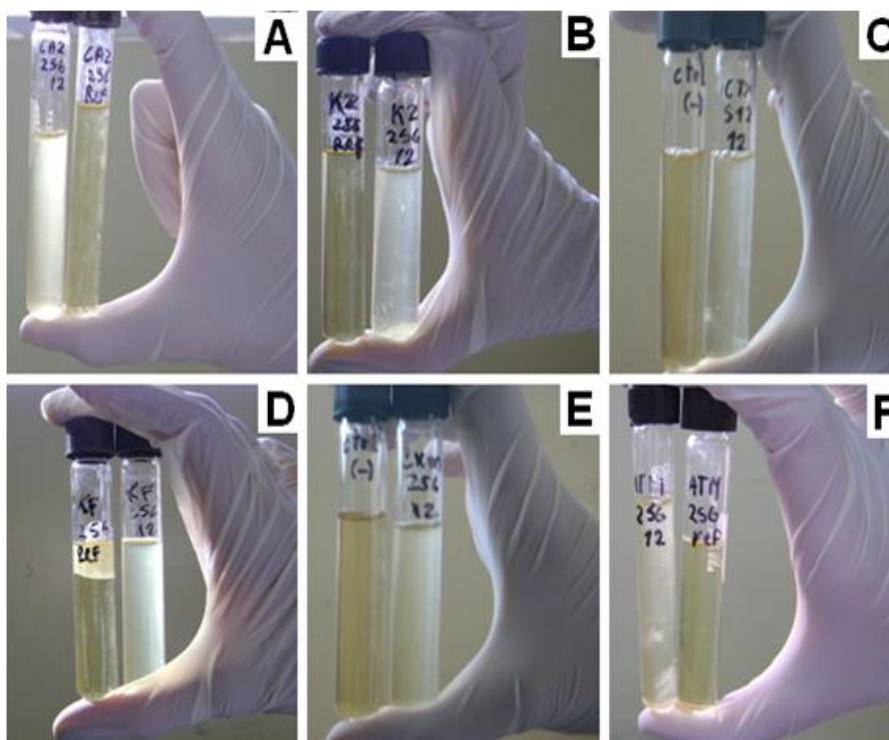
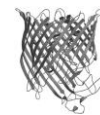


Figura 5. Concentración inhibitoria mínima para la cepa N° 12 en medio LB suplementado con las máximas concentraciones de cada antibiótico. A: CAZ, >256; B: CZ, >256; C: CTX, >512; D: CF, >256; E: CXM, >256; F: ATM, >256.



En total se encontraron 8 fenotipos diferentes de resistencia en las 9 cepas resistentes, el fenotipo 3 presenta resistencia a cefalotina y cloranfenicol, y el fenotipo 7 solo presenta resistencia a cloranfenicol, siendo estos dos fenotipos los que presentan menos resistencias (Tabla 4).

Tabla 4. Diferentes fenotipos encontrados en las cepas resistentes de *Klebsiella*

Fenotipo	Resistencia
1	CAZ, CF, CN
2	CZ, CF, C
3	CF, C
4	CZ, CF, CIP, CN
5	CAZ, CZ, CTX, CF, CXM, ATM
6	CZ, CF, ATM, CN
7	C
8	CZ, CTX, CF, CXM, ATM

CAZ: ceftazidima, CZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, AK: amikacina, CF: cefalotina, CXM: cefuroxima, C: cloranfenicol, IMI: imipenem, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, CN: gentamicina.

6.3. Presencia de los genes *OmpK35*, *OmpK36* y *OmpK37* por PCR

Los productos generados por la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) mostraron presencia del gen *OmpK36* en las cepas 9, 12, 18, 22, 23 y en la cepa de referencia ATCC 13883 (Fig. 6), el gen *OmpK35* se observó en las cepas 4, 12, 18, 22, 23 y ATCC 13883 (Fig. 7), estos dos genes presentan el tamaño indicado previamente (Albertí *et al.*, 1999; Doménech-Sánchez *et al.*, 1999; Doménech-Sánchez *et al.*, 2003). El gen *OmpK37* solo ha sido reportado en el estudio de Doménech-Sánchez *et al.*, (1999) y no se observó en ninguno de los aislados incluidos en este trabajo, sumado a esto, se ha reportado que la ausencia de la porina *OmpK 37* no tiene ninguna relación con la resistencia (Kaczmarek *et al.*, 2006).

Siendo *OmpK35* un gen de origen cromosomal y *OmpK36K* de origen plasmídico, el hecho de que la mayoría de aislados que presentan uno de los genes presentan el otro, es posible que exista una relación entre la presencia y la expresión de ambos, sin embargo este fenómeno aun no ha sido estudiado.

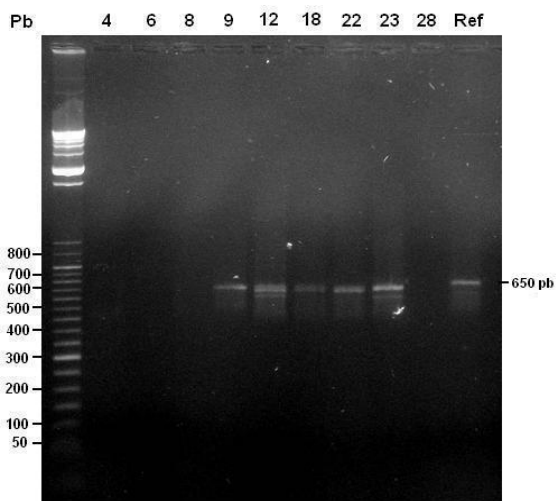
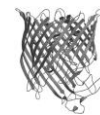


Figura 6. Amplificación por PCR del gen *OmpK36* en cepas resistentes de *Klebsiella pneumoniae*. Pb: marcador de peso molecular en pares de bases, 4-28: cepas resistentes, Ref: cepa de referencia ATCC 13883.

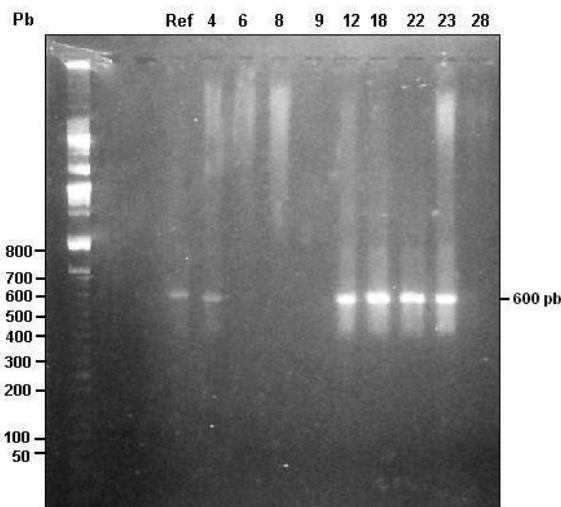


Figura 7. Amplificación por PCR del gen *OmpK35* en cepas resistentes de *Klebsiella pneumoniae*. 4-28: cepas resistentes, Ref: cepa de referencia ATCC 13883.

Por otro lado la presencia del gen no indica directamente la expresión de las porinas, Doumith *et al.*,(2009) reportan varias mutaciones puntuales y la presencia de secuencias de inserción que alteran las secuencias codificantes de las porinas o mutaciones en la región promotora, la restauración de los genes *OmpK35* o *OmpK36* en aislados de *Klebsiella* y *OmpC* o *OmpF* en aislados *Enterobacter spp.* disminuyen considerablemente las CIM de todos los carbapanemes cuando no se halla evidencia del funcionamiento de bombas de flujo que contribuyan a la resistencia.

6.4. Perfil de porinas

El análisis por SDS-PAGE mostro que todos los aislados sensibles expresan Las dos proteínas porinas *OmpK35* y *OmpK36*, mientras que la mayoría de los aislados resistentes carecen de una o ambas proteínas (Fig. 8), además los dos aislados resistentes que expresaron estas proteínas presentan los fenotipos con menos resistencias (Tabla 5).

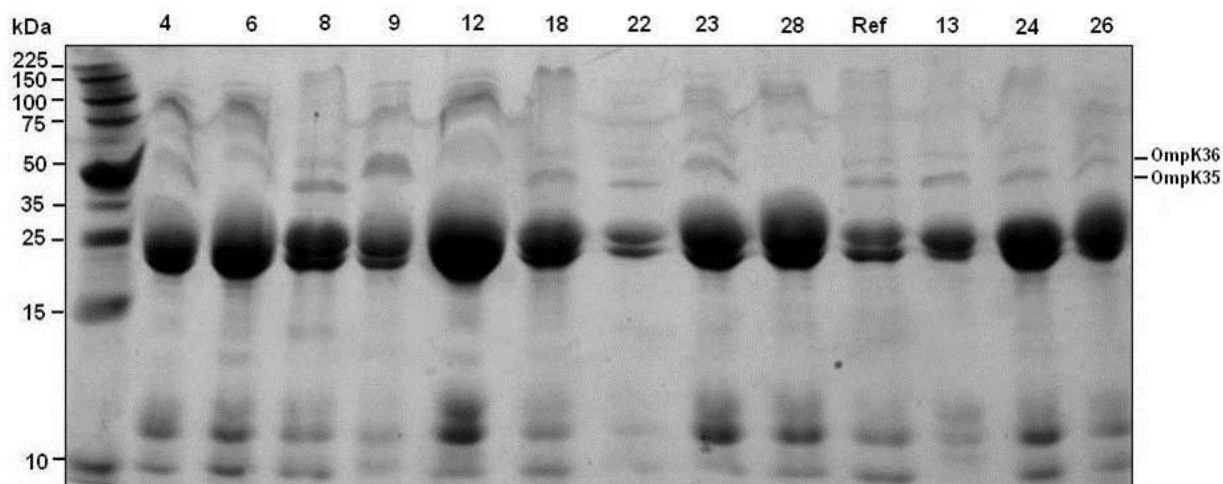
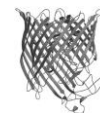


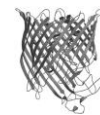
Figura 8. Perfil de PME en SDS-PAGE al 10% de aislados de *Klebsiella pneumoniae*. kDa: marcador de peso molecular en Kilodaltones. 4-28: cepas resistentes, Ref: cepa de referencia ATCC 13883, 13-26: cepas sensibles. OmpK36 correspondiente a un tamaño aproximado de 40 kDa, OmpK35 correspondiente a un tamaño aproximado de 37 kDa

Tabla 5. Perfil de porinas asociado a los perfiles de resistencia en los aislados de resistentes de *Klebsiella*.

CEPA	OmpK35	OmpK36	Fenotipo de resistencia
4	-	-	1 (CAZ, CF, CN)
6	-	-	2 (CZ, CF, C)
8	+	+	3 (CF, C)
9	-	+	4 (CZ, CF, CIP, CN)
12	-	-	5 (CAZ, CZ, CTX, CF, CXM, ATM)
18	-	+	6 (CZ, CF, ATM, CN)
22	+	+	7 (C)
23	-	+	8 (CZ, CTX, CF, CXM, ATM)
28	-	-	5 (CAZ, CZ, CTX, CF, CXM, ATM)
Ref	+	+	-

Ref: cepa de referencia ATCC 13883 como control negativo. OmpK35/OmpK36: Presencia de las Porinas OmpK35/OmpK36. CAZ: ceftazidima, CZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, AK: amikacina, CF: cefalotina, CXM: cefuroxima, C: cloranfenicol, IMI: imipenem, ATM: aztreonam, CIP: ciprofloxacina, CN: gentamicina.

En los aislados 4, 6, 12 y 28 no se observó presencia de ninguna de las dos porinas evaluadas (OmpK35 y OmpK36), estos aislados tienen resistencia absoluta común a CF, la resistencia a CF en los otros aislados se asoció a la ausencia de la OmpK35 aunque

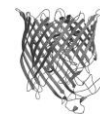


también de manera absoluta, mientras que el aislado número 8 presenta expresión de ambas porinas y resistencia absoluta a CF, lo que sugiere que la resistencia a CF es independiente de la presencia o ausencia de ambas porinas, estos resultados concuerdan además con el reporte de Melano *et al* (2003) quien encontró resistencia absoluta en dos aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* con diferente perfil de porinas. CF es una cefalosporina, y como tal su mecanismo de acción es interferir en la síntesis de peptidoglucano de la pared celular, su mecanismo de resistencia es la disminución en la penetración a través de la membrana y la producción de beta-lactamasas, las cuales en las bacterias gram-negativas están situadas entre la membrana celular interna y externa y el lugar de síntesis está en la parte externa de la membrana celular interna, siendo su situación estratégica pues protege de forma máxima dicho microorganismo (Zamora *et al.*, 1998); sugiriendo que la resistencia en estas cepas es por modificación enzimática por beta-lactamasas.

La resistencia absoluta a CAZ (cefalosporina) se observó en los aislados 4, 12 y 28 en ausencia de ambas porinas. Estos resultados concuerdan con los estudios de Rasheed *et al.*, (2001), quien reporta que OmpK35 es completamente necesaria para la entrada de este antibiótico a la célula, mientras que la presencia de OmpK36 disminuye las CIM pero no hace a la bacteria completamente sensible, concluyendo que la mayor fracción de antibiótico ingresa por la OmpK35.

Melano *et al.*, (2003) encontró que la ausencia de OmpK35 se asoció también a la resistencia a CN (aminoglucósido) igual que los resultados de este estudio para los aislados 4, 9 y 18, esto se ve reflejado en que el mecanismo de acción de CN consiste en interferir en la síntesis normal de proteínas, originando proteínas no funcionales en microorganismos susceptibles, y para ejercer su acción deben ingresar en la célula bacteriana, esto ocurre por un mecanismo de transporte activo, dependiendo del potencial transmembrana (Barranco, 1998).

La expresión de OmpK35 igualmente está asociada a la reducción de las CIM para CTX (cefalosporina) en este estudio, lo cual contradice lo reportado por Melano *et al.*, (2003), el cual encontró que la entrada de CTX a la célula no se ve afectada por la ausencia de alguna de estas dos porinas.



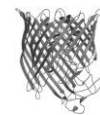
La resistencia a C se encontró tanto en el aislado 6 que carece de ambas porinas, así como en el aislado 8 y el 22 que expresan ambas porinas, lo cual indica que la entrada de C es por una vía alterna a OmpK35/36, lo que a su vez concuerda con la descripción de la resistencia a cloramfenicol propuesta por Bissonnette *et al.*; (1991), la cual se adjudica únicamente a la producción de acetiltransferasas, que por mono y diacetilación evitan la unión subsecuente del cloramfenicol a la subunidad ribosomal 50S.

La resistencia a CZ (cefalosporina) se observó en los aislados 6, 12, 18 y 28 en ausencia de ambas porinas, mientras para los aislados 9 y 23 solo en ausencia de OmpK35, mientras que en los aislamientos sensibles se observó la presencia de las dos porinas, CZ tiene su blanco al interior de la pared celular por lo que es de suponer que la resistencia a este se relaciona a la impermeabilidad de la membrana externa, el mismo comportamiento se observa en los aislados resistentes a CXM (cefalosporina) sin embargo no se han reportado estudios que incluyan estos dos antimicrobianos.

La resistencia a ATM también se asoció directamente a la ausencia de OmpK35, ATM es un antibiótico monobactámico, su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared celular de las bacterias Gram-negativas (Rivero *et al.*, 1998), por lo tanto su entrada a la célula es esencial.

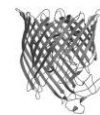
La resistencia a CIP solo se observó en la cepa 9, la cual pertenece a la especie *Klebsiella oxytoca* y solo expresó la porina OmpK36, el mecanismo de acción de este antibiótico es inhibir la enzima ADN girasa de una forma que detiene el metabolismo bacteriano y el mecanismo de resistencia es la disminución de la permeabilidad de la membrana celular por reducción en las porinas de dicha membrana (Cordiés *et al.*, 1998), si debe entrar a la bacteria, posiblemente lo haga a través de la porina OmpK35 según lo sugerido en los resultados obtenidos en este trabajo. La literatura reportada no indica alguna relación de CIP con las porinas OmpK35 y OmpK36 (Melano *et al.*, 2003; Hernández-Allés *et al.*, 2000; Kaczmarek *et al.*, 2006).

El IMI es un carbapenem, su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared bacteriana, especialmente el peptidoglicano en varias bacterias gram-negativas (Rivero *et al.*, 1998), por lo tanto es necesaria su entrada a la pared celular. Se han reportado datos que muestran una relación en la deficiencia de porinas con los aumentos en las CIM o



resistencias absolutas para IMI (Padilla *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Kaczmarek *et al.*, 2006; Skopková-Zarnayova *et al.*, 2005; Melano *et al.*, 2003), sin embargo en este trabajo no se encontró ningún aislamiento resistente a imipenem lo cual se explica posiblemente por entradas alternativas a OmpK35/36 hacia el interior de la bacteria, y por el hecho de ser una opción terapéutica restringida, lo que disminuye los índices de exposición (Cordiés *et al.*, 1999).

El mecanismo de acción de AK, es unirse irreversiblemente a la subunidad 30S ribosomal de las bacterias inhibiendo la síntesis de proteínas, se conoce que este antibiótico entra a la célula por medio de un transporte pasivo a través de las porinas de la pared celulares (Edson *et al.*, 1999), pero debido a que todas las cepas fueron sensibles a este antibiótico y no todas las cepas expresaron las porinas OmpK35 y OmpK36, sugiere que estas proteínas no son necesarias para la entrada de AK, y que tal vez entra por una vía alterna. Este antibiótico es el único aminoglucósido evaluado en este trabajo, y no se han reportados datos asociados a las porinas OmpK35 y OmpK36.



7. CONCLUSIONES

De 37 aislados con identificación presuntiva de *Klebsiella pneumoniae*, 10.8% fueron identificadas como *Klebsiella oxytoca*, 64.8% como *Klebsiella pneumoniae* y 24.3% no pertenecieron realmente al género *Klebsiella*.

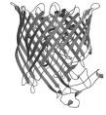
Los perfiles de sensibilidad por el método de difusión en disco coincidieron con las concentraciones inhibitorias mínimas, y se identificaron ocho fenotipos diferentes de resistencia.

Todos los aislados sensibles analizados por SDS-PAGE, presentaron las porinas OmpK35 y OmpK36 y los aislados resistentes que expresaron las dos porinas son los que presentan el menor número de resistencias a los antimicrobianos.

Se observó relación directa entre la ausencia de expresión de OmpK35 y la resistencia a ceftazidima, cefazolina, cefuroxima, cefotaxima, aztreonam, ciprofloxacina y gentamicina, OmpK36 no influyó en las resistencias encontradas ni en decrecimientos de las concentraciones inhibitorias mínimas.

El único aislado resistente a ciprofloxacina fue de la especie *Klebsiella oxytoca* y no se halló resistencia alguna a amikacina e imipenem.

Este es el primer informe en Colombia en el que se caracterizan molecularmente aislados *klebsiella* por expresión de porinas y su asociación a la resistencia a antimicrobiales. La importancia de este estudio radica en la relación existente en la expresión de porinas y la resistencia a antimicrobianos.

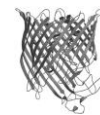


8. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de inhibidores de enzimas y bombas para observar el comportamiento de la expresión de porinas

Asociar los perfiles de porinas de los aislados con sus estudios epidemiológicos para observar el comportamiento de las porinas en poblaciones.

Incluir un número mayor de aislados para aplicar métodos estadísticos para contar con resultados cuantitativos y determinar su significancia.



9. BIBLIOGRAFÍA

Albertí, S. Marqués, G. Camprubí, S. Merino, S. Tomás, J. M. Vivanco, F. and Benedí. 1993. V. J. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 61:852–860.

Albertí, S. Rodríguez-Quiñones, F., Schirmer, T., Rummel, G., Tomás, J. M., Rosenbusch, J. P. & Benedí, V. J. 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional structure, and complement binding. *Infect Immun* 63, 903±910.

Ardanuy, C. Linares, J. Dominguez, M.A. Hernandez-allés, S. Benedí, V. Martínez-martínez, L. 1998. Outer Membrane Profiles of Clonally Related *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Clinical Samples and Activities of Cephalosporins and Carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42 (7): 1636–1640.

Bassford, P. J. Diedrich, Jr., D. L. Schnaitman, C. L. and Reeves, P. 1977. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. VI. Protein alteration in bacteriophage-resistant mutants. *J. Bacteriol.* 131:608-622.

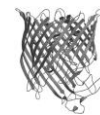
Bagley, S. T., Seidler, R. J., Talbot, H.W., Morrow, J.E. 1978. Isolation of *Klebsiellae* from within living wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:178–185.

Barranco, E. 1998. Aminoglucósidos. *Acta medica.* 8(1): 48-53.

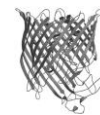
Bender, L., Blum, G., Schmittroth, M., Achtman, M., Tschape, H., Hacker, J. 1991. Virulence patterns and long-range genetic mapping of extraintestinal *Escherichia coli* K1, K5, and K100 isolates: use of pulsed-field gel electrophoresis. *Infect. Immun.* 59:2664–2672.

Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J., Roy, P. 1991. Characterization of the Nonenzymatic Chloramphenicol Resistance (cmIA) Gene of the 1n4 Integron of Tn1696: Similarity of the Product to Transmembrane Transport Proteins. *J. Bacteriol.* 173(14): 4493-4502.

Bradford, P. A. 2001. Extended-Spectrum beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(4): 933–951.



- Brown, C. Seidler, R. J. 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Microbiol.* 25:900–904.
- Carlone, G. M. Thomas, M. L. Rumschlag, H. S. & Sottnek. F. O. 1986. Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus* species. *J. Clin. Microbiol.* 24:330–332.
- Cordiés, L. Machado, L.A. Hamilton, L.M. 1998. Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta medica.* 8(1):58-65.
- Cordiés, L.J. Machado, L.A. Hamilton, M.L. 1999. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta medica.* 8(1): 13-27.
- Crowley B, Benedí V, Doménech-Sánchez A. 2002. Expression of SHV-2 β -Lactamase and of Reduced Amounts of OmpK36 Porin in *Klebsiella pneumoniae* Results in Increased Resistance to Cephalosporins and Carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 46(11): 3679–3682
- Doménech-sánchez, A. Hernández-allés, S. Martínez-martínez, L. Benedí, V.J. Albertí, S. 1999. Identification and Characterization of a New Porin Gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its Role in b-Lactam Antibiotic Resistance. *Journal of bacteriology.* 181 (9): 2726–2732.
- Doménech-Sánchez, A. Martínez-Martínez, L. Hernández-Allés, S. Conejo, M. Pascual, A. Tomás, J.M. Albertí, S. and Benedí, V. 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 47 (10): 3332–3335.
- Doumith, M. Ellington, M.J. Livermore, D.M & Woodford,N. 2009. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63: 659–667.
- Edson, RS. & Terrell, CL. 1999. The aminoglycosides. *Mayo Clin Proc.* 74(5): 519-28.
- Hernández-Allés, S. Albertí, S. A lvarez, D. Doménech-Sánchez, A. Martínez-Martínez, L. Gil, J. Tomás, J.L. Benedí, V.J. 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* 145, 673–679.



Hernández-Allés, S. Conejo, M.C. Pascual, A. Tomás, J.M. Benedí, V.J. Martínez-Martínez, L. 2000. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46: 273-277.

Högenauer, C. Langner, C. Beubler, E. Lippe, I. Schicho, R. Gorkiewicz, G. Krause, R. Gerstgrasser, N. Krejs, G. & Hinterleitner, T. 2006. *Klebsiella oxytoca* as a Causative Organism of Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis. *The new england journal of medicine*. 355: 2418-26.

Jiang, X. Espedido, B.A. Partridge, S.R. Thomas, L.C. Wang, F. Iredell, J.I. 2009. Paradoxical effect of *Klebsiella pneumoniae* OmpK36 porin deficiency. *Pathology*. 41(4): 388-392.

Kaczmarek, F.M. Dib-Hajj, F. Shang, W. & Gootz, T.D. 2006. High-Level Carbapenem Resistance in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate Is Due to the Combination of blaACT-1 B-Lactamase Production, Porin OmpK35/36 Insertional Inactivation, and Down-Regulation of the Phosphate Transport Porin PhoE. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 50 (10): 3396–3406.

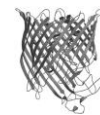
Kaneko, M. Yamaguchi, A. and Sawai. T. 1984. Purification and characterization of two kinds of porins from the *Enterobacter cloacae* outer membrane. *J. Bacteriol*. 158:1179–1181.

Kim, S.Y. Park, Y.J. Yu, J.K. Kim, H.S. Park, Y.S. Yoon, J.B. Yoo, J.Y Lee, K. 2007. Prevalence and mechanisms of decreased susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *DiaCnostic Microbiology and Infectious Disease* 57: 85-91.

Koebnik, R. Locher, C.P. & Gelder. P.V. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*. 37(2): 239-253.

Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C., Winn W. C. 2001. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color. Primera Reimpresión de la Quinta Edición.* Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 207-210.

Lee, K. Yong, D. Choi, Y.S. Yuma, J.H. Kimb, J.M. Woodford. N Livermore, D.M. Chong, Y. 2007. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with



plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 B-lactamases co-mediated by porin loss. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 29: 201–206

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

Martínez, P. J., Espinal, P. A., Bustos, A., Mattar, S. 2005. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Med. UNAB*; 8 (1):15-22.

Martínez-Ramos A, Isibasi A. 2001. Estudio de los antígenos superficiales de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*. I. Las proteínas de la membrana externa. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 21(3): 91-96

Melano, R. Corso, A. Petroni, A. Centrón, D. Orman, B. Pereyra, A. Moreno, N. & Galas, M. 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 36–42.

Mendes, C. Kifferl, C. Segura, A. Ribeiro, J. Turner, P. 2004. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. *Brazilian journal of infectious diseases*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 8(1): 109-111.

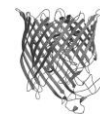
Merck E.1994. *Manual de Medios de Cultivo*. Darmstadt, Alemania. REG. NR. 1751-01

National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*. 2006. CLSI document M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087-1898.

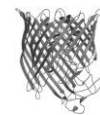
NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=570>

Neu, H. C. 1992. The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*; 257(21):1064-1073

Nikaido, H. & Vaara, M. 1985. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. *Microbiological reviews*. 49 (1). 1-32.



- Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* 269:3905–3908.
- Paterson, D. L., Bonomo, R. A. 2005. Extended-Spectrum b-lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(4): 657–686.
- Padilla, E. Alonso, D. Doménech-Sánchez, A. Gomez, C. Pérez, J.L. Albertí, S. & Borrell, N. 2006. Effect of Porins and Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases on the Efficacy of β -Lactams in Rat Pneumonia Caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 50 (6): 2258–2260.
- Podschn, R. Pietsch, S. Höller, C. & Ullmann, U. 2001. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Applied and environmental microbiology.* 67 (7): 3325-3327.
- Podschn, R. Ullmann, U. 1998. *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical microbiology reviews.* 589–603.
- Rasheed, J.M. 2001. Is OmpK35 Specific for Ceftazadime Penetration?. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 45 (5): 1601-1602.
- Rivero, E. Herrera, M.L. LARRONDO, H. LOZANO, D. LEÓN, D. 1998. Carbapenémicos y monobactámicos. . *Acta medica.* 8(1): 66-70.
- Rosenbusch, J. P. 1974. Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecylsulfate binding. *J. Biol. Chem.* 249:8019-8029.
- Sawai, T. Hirano, S. & Yamaguchi, A. 1987. Repression of porin synthesis by salicylate in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett* 40, 233±237.
- Scatamburlo, M.A. Chartone, E. Alencar, C. 2004. Multidrug efflux systems in gram-negative bacteria . *Brazilian Journal of Microbiology.* 35: 19-28.
- Schembri, M., Dalsgaard, D., Klemm, P. 2004. Capsule Shields the Function of Short Bacterial Adhesins. *Journal of Bacteriology;* 186(5): 1249–1257.



Skopková-Zarnayova, M. Siebor, E. Rovna, D. 2005. Outer membrane protein profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates that differ in ceftiofur resistance. FEMS Microbiology Letters 243: 197–203

Tafur, J., Torres, J., Villegas, M. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. Infectio; 12(3):217-226.

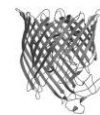
Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine; 119 (6A):3–10

Umeh, U. Berkowitz, L. 2009. *Klebsiella* Infections. [emedicine.medscape.com. http://emedicine.medscape.com/article/219907-print](http://emedicine.medscape.com/article/219907-print)

van Embden, J. Cousins, D.V. Williams, S.N. Liébana, E. Aranaz, A. Bunschoten, A. And Ellis, T. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigation of bovine tuberculosis. J.Clin.Microbiol. 36: 168 –178.

Williams, P., Lambert P. A., Brown, M. R., Jones, R. J. 1983. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. J. Gen. Microbiol; 129:2181–2191.

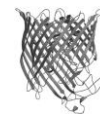
Zamora, R. Areu, A. Gundián, J. Manresa, R. Sánchez, J. & Morales, R. 1998. Cefalosporinas. Acta medica. 8(1): 40-7.



10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Aislamiento del ADN genómico.

1. Cultivar en caldo LB la especie de *Klebsiella* de interés e incubar a 37°C y dejar toda la noche, obteniendo una turbidez del medio para obtener una adecuada cantidad de colonias.
2. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C para concentrar las colonias en el fondo del tubo.
3. Calentar durante 20 minutos a 80°C por ebullición para inactivar las bacterias, luego enfriar a temperatura ambiente.
4. Adicionar 50 µl de de lizozima de 10 mg/ml, mezclar mecánicamente e incubar a 37°C toda la noche.
5. Adicionar 80 µl de la mezcla SDS 10% / Proteinasa K (70 µl y 10 µl respectivamente), mezclar manualmente e incubar 10 min. a 65°C.
6. Adicionar 100 µl de NaCl 5M.
7. Adicionar 100 µl de solución CTAB/NaCl, la cual debe ser precalentada a 65°C durante 10 minutos. Mezclar manualmente hasta que el líquido sea blanco. Incubar 10 min. a 65°C.
8. Adicionar un volumen (alrededor de 750 µl) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), mezclar por inversión mínimo durante 10 seg., y centrifugar a temperatura ambiente por 10 min. a 12000 g. Transferir la fase acuosa a otro vial.
9. Añadir cuidadosamente 0.6 volúmenes (~450 µl) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar por inversión. Mirar el tamaño del precipitado y estimar la cantidad de buffer TE 1x dentro del cual se disolverá el ADN en el paso 18.
10. Incubar 60 min. a -20°C.
11. Centrifugar 15 min., 4°C a 12000 g.
12. Transferir el sobrenadante a otro vial.



13. Adicionar al pellet 1 ml de etanol al 70% y mezclar por inversión.
14. Centrifugar 15 min. a 4°C. Descartar el sobrenadante.
15. Repetir los pasos 14 y 15.
16. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
17. Resuspender el pellet en la cantidad estimada de buffer TE 1x estimada en el paso 10 (~50 µl). El ADN puede ser almacenado a 4°C si es necesario.

10.2. Anexo 2. Extracción de proteínas de membrana externa.

Suspender el pellet celular en 1 ml de buffer HEPES 10 mM (pH 7.4), y mantenerlo en hielo un momento.

1. Sonicar (6 estallidos, 10 segundos cada uno a 40W)
2. Las células rotas y los escombros son removidos por centrifugación a 15600g x 2 min a 4°C.
3. Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml, y centrifugar la membrana celular por centrifugación a 15600g x 30 min a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante y suspender el pellet (membrana celular) en 0.2 ml de buffer HEPES 10 mM (pH 7.4) por pipeteado repetido.
5. Solubilizar la membrana citoplasmática por adición de un volumen igual de Sarkosyl (N-lauroyl sarcosinato de sodio) al 2% en HEPES 10 mM (pH 7.4).
6. Incubar a temperatura por 30 min con mezcla intermitente.
7. Sedimentar la membrana externa por centrifugación (como se ha descrito antes).
8. Descartar el sobrenadante, lavar una vez el pellet (membrana externa) sin resuspender, con 0.5 ml de HEPES 10 mM.
9. Suspender el pellet (membrana externa) en 50 a 100 µl de buffer HEPES 10 mM.