

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Licenciado en
Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* de productos
agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo

Autor: Arauz López Favio Bladimir

Tutor: Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda

Riobamba - Ecuador

Año 2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de Graduación del Proyecto de Investigación, **PERFILES DE BANDAS GENÉTICAS DE *Klebsiella oxytoca pneumoniae* DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS Y AGUAS DE RIEGO DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO**, presentado por el **Sr. Favio Bladimir Arauz López** y dirigido por el **Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda**, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del presente trabajo con fines de graduación, en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente, para uso y custodia de la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Ximena Robalino
Presidente del tribunal



Firma
Digital

Firma

Mgs. Yisela Ramos
Miembro del tribunal



Firma válida solo para:
Titulación Especial

Firma

MsC. Celio García
Miembro del tribunal



Firma válida solo para:
Evidencias act.doc

Firma

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda
Tutor del proyecto

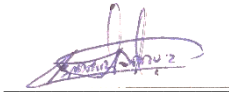


Firma

Firma

AUTORÍA

El contenido del presente proyecto de investigación corresponde exclusivamente a Favio Bladimir Arauz López como responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el presente trabajo de investigación titulado **PERFILES DE BANDAS GENÉTICAS DE *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS Y AGUAS DE RIEGO DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO**, y de mi tutor de proyecto, Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda, el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Favio Bladimir Arauz López

C.C: 0605096718

AGRADECIMIENTO

Dios que con su bendición y sabiduría ha sabido guiarme y proporcionarme la fortaleza para seguir adelante. Mi familia por ser el soporte principal y guía en el camino del bien.

Y de manera muy especial a la carrera Laboratorio Clínico e Histopatológico y sus docentes que imparten su conocimiento para formar personas competentes en esta sociedad, y un agradecimiento especial al Mgs. Félix Falconí por ser la guía durante el proceso de este proyecto.

DEDICATORIA

No es fácil expresar con frases cortas lo que siento en este momento.

Dedico de manera muy especial a mis dos madres Sara Arauz y Rosario López y a mi Padre Ángel Arauz que desde el cielo me guía que con todo el esfuerzo y sacrificio han hecho posible que llegue este momento. A mi esposa Mishel y mi hijo Carlitos que se volvieron la fortaleza para seguir adelante, a mis hermanas y padre adoptivo Ernesto Cando, a mis tíos que son como mis hermanos que siempre me ayudaron ,pero de manera muy especial a mi tío Geovanny Arauz que siempre estuvo ahí ayudándome, aconsejándome en todo momento. Por todo esto Familia muchas gracias.

ÍNDICE

PORTADA	I
REVISIÓN DEL TRIBUNAL	II
AUTORÍA	III
AGRADECIMIENTO	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
Aguas de riego.....	4
Calidad del agua en productos agrícolas.....	4
Ríos contaminados de la provincia de Chimborazo	4
Género <i>Klebsiella</i> spp	5
Variación Genética	5
Tipos de Variación Genética.....	6
Depósito de secuencias genómicas.....	6
Cultivo.....	6
Preparación	7
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	8
Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación.....	9
RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar)	9
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	12
Tipo de investigación	12
Técnicas de Microbiología	13
Para contar con un stock de cepas bacterianas recién crioconservadas fue necesarias realizar una reactivación, para lo cual, se procedió a la preparación de las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Oxytoca</i> , que gentilmente fueron provistas del semillero de investigación de la Universidad Nacional de Chimborazo por la DR. María del Carmen Cordobés donde se encargan del estudio de bacterias patógenas en aguas y productos agrícolas de la provincia de Chimborazo.	13
Tabla 1: Muestras provistas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
Crioconservación de las bacterias	14

Análisis de secuencias basado en el genoma de <i>Klebsiella</i> para evaluar oligonucleótidos como iniciadores en la técnica de PCR.....	14
Extracción ADN genómico de colonias de <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>pneumoniae</i>	15
Preparación de reactivos para la PCR.....	16
Consideraciones éticas.....	17
CAPÍTULO III:	18
RESULTADOS	18
Secuencia del iniciador para la técnica de PCR basado en el genoma de <i>Klebsiella</i>	
Diseño y Análisis de Iniciadores.	18
Imagen 1: Secuencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtenida en la base de datos Gen Bank donde la secuencia seleccionada OPA 13 se encuentra subrayada y es el sitio blanco escogido sobre el cual se diseñó el iniciador.	18
ADN genómico de colonias de <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>pneumoniae</i>	18
Imagen 2: Observación de ADN por electroforesis en gel	19
Imagen 3: Extractos de ADN productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel	19
Imagen 4: Perfil de bandas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por PCR con Iniciadores OPA13,	20
Imagen 5 : Profile de bandas de <i>Klebsiella.oxytoca</i> por PCR con Iniciadores OPA13	21
Perfil de bandas genéticas entre <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i>.	22
Imagen 6: Perfiles de bandas de <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>pneumoniae</i> por PCR	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	24
RECOMENDACIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS.....	29
ANEXO 1: Constancia de la adquisición del iniciador y su secuencia	29
ANEXO 2: Evidencias Fotográficas.....	30

RESUMEN

La variación genética es un determinante clave que sustenta la evolución de todo ser vivo demostrando características de supervivencia, como es el caso de *Klebsiella* que es un importante patógeno cuya epidemiología ha sido ampliamente estudiada, las técnicas más usadas para la identificación son bioquímicas, las mismas que es imposible diferenciar variación genética entre subgéneros, las herramientas moleculares han demostrado utilidad para diagnosticar, caracterizar, tipificar y cuantificar los agentes etiológicos. Se realizó un estudio descriptivo no experimental, constituida por catorce cepas de *Klebsiella* aisladas de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo, de las cuales 7 son *Klebsiella oxytoca* y 7 *Klebsiella pneumoniae* con el objetivo de determinados perfiles de bandas genéticas mediante la técnica de PCR, la misma que permitió la diferenciación genotípica intraespecífica de las bacterias. Se procedió a realizar un análisis bioinformático para la selección del iniciador, posteriormente la realización de la PCR. Como resultado se obtuvo amplificaciones con los patrones totalmente diferentes en *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae*. El agente bacteriano *Klebsiella pneumoniae*, mostro cuatro cepas con igual patrón de bandas y tres cepas con perfiles distintos, *Klebsiella oxytoca* por su parte presento cuatro cepas bacterianas con perfiles de bandas idénticas y tres cepas con perfil de bandas distintas. Este estudio revela que no basta con solo identificar con métodos cotidianos como es la bioquímica, sino realizar ensayos con técnicas moleculares que ayuden a identificar el genotipo de la bacteria.

Palabras claves: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, PCR, Iniciadores, ADN Intraespecífica.

ABSTRACT

Genetic variation is a key determinant that supports the evolution of every living being, demonstrating survival characteristics, as is the case of *Klebsiella pneumoniae*, which is an important pathogen whose epidemiology has been widely studied, the most used techniques for identification are biochemical, Since it is impossible to differentiate genetic variation between subgenera, molecular tools have proven useful to diagnose, characterize, typify and quantify etiological agents. In the present investigation, profiles of genetic bands of *Klebsiella oxytoca* and *pneumoniae* belonging to agricultural products and irrigation waters have been determined by means of the PCR technique, which allowed the intraspecific genotypic differentiation of bacteria. A bioinformatic analysis was carried out to select the initiator, followed by PCR. As a result, amplifications with totally different patterns were obtained in *Klebsiella oxytoca* as well as *Klebsiella pneumoniae*, individually they presented totally different molecular weights, *Klebsiella oxytoca* presented its standard band of the isolates with an amplification of 660bp. *Klebsiella pneumoniae*, its pattern band was presented with a repetitive 1300bp amplification. This study reveals that it is not enough just to identify with everyday methods such as biochemistry, but to carry out tests with molecular techniques that help identify the genotype of the bacterium.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, PCR, Initiators, Intraspecific DNA.

INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo la evolución que existe en las bacterias ha conducido a la aparición de cambios, manifestándose en sus características de supervivencia. Particularmente en los géneros *Klebsiella*, una bacteria oportunista, que tiene una alta prevalencia de causar infecciones intrahospitalarias como la neumonía, sepsis e infección del tracto urinario ⁽¹⁾. Por la necesidad de adaptarse, las mismas que al sentirse amenazadas, su naturaleza tiene la capacidad de generar reacción que se expresa en resistencia para mantener la supervivencia en el medio ⁽²⁾.

Las apariciones de nuevas secuencias nucleotídicas en el genoma de bacterias se encuentran en constante dinamismo, manifestándose en sus características de supervivencia, originan resistencias al régimen terapéutico. Siendo así que en su estructura molecular existen cambios, por lo que la primera clasificación del género de *Klebsiella* se basó en criterios clínicos y permitió diferenciar tres especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* y *Klebsiella rhinoscleromatis*. ⁽³⁾.

Posteriormente por métodos taxonómicos moleculares esta clasificación original fue revisada, predominando actualmente la establecida por Ørskov en 1984 que clasifica al género *Klebsiella* en 5 especies, basándose en las características fenotípicas y bioquímicas: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* y *K. planticola* ⁽⁴⁾. Estos métodos no ayudan a una correcta tipificación y diferenciación entre los aislados, sobre todo cuando estos presentan cambio en su secuencia nucleotídica. El no poder definir una característica particular que pueda hacer una diferenciación por técnicas tradicionales impide poder reconocer variación dentro de la misma especie implica varios inconvenientes a nivel de la toma de decisiones dentro de los laboratorios para especificar un resultado fidedigno ⁽⁵⁾.

En América del Sur en países como Colombia, Argentina, Brasil y Uruguay en el año 2006 se reportó inicialmente en *K. pneumoniae* variación genética y subsecuentemente en varias especies de enterobacterias ⁽⁶⁾. En Ecuador actualmente no se cuenta con suficiente información y tecnología para identificar en el genoma bacteriano, cuando se presentan diferencias en su estructura molecular, siendo causa de problemas de salud de creciente frecuencia y de alta complejidad ⁽⁷⁾.

En estudios previos, ⁽⁸⁾ se han aislado bacterias de diferentes sitios de la provincia de Chimborazo entre las cuales *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*, han mostrado diferentes resultados en el grado de resistencia a antibióticos, lo que podría sugerir que presenten variación en perfiles de bandas genéticas, al hacer uso de la técnica de amplificación aleatoria para verificar el polimorfismo del ADN, lo que permite tener una forma de diferenciarlas entre el grupo; entendiéndose que estas diferencias han sido causadas por los cambios en las secuencias nucleotídicas del genoma.

Las técnicas de identificación por Reacción de Polimeración en Cadena (PCR), son de alta confiabilidad por su especificidad y sensibilidad ⁽⁹⁾. La presente investigación de perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo, posee mucha importancia, debido a que el estudio de este patógeno bacteriano es de interés clínico en todo el mundo, por ser causante de alta morbimortalidad generando preocupación constante ⁽¹⁰⁾.

En diferentes estudios se han presentado análisis filogenéticos utilizando en las técnicas, secuencias aleatorias cortas iniciadoras para la etapa de hibridación ^(2,11). Estos ensayos moleculares son una herramienta en los estudios de diversidad filogenéticos entre los microorganismos y a nivel entre especies ⁽⁵⁾.

El presente trabajo se basó en él estudió perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* usando el iniciador OPA-13, que basado en las referencias de varias investigaciones, le da un carácter de mayor seguridad en la identificación intraespecífica de la bacteria, pues han generado en los resultados amplicónes reproducibles, lo que le da un carácter específico y de diferenciación por los perfiles de bandas de ADN que se obtienen, mediante el uso de la técnica de la PCR.

Por esta razón se aplicó técnicas de análisis de ADN por PCR mostrando la variación de patrones bandas genéticas intraespecífica en *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo, lo que permitió establecer las diferencias evidentes entre estas especies bacterianas; siendo útil en la tipificación.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* pertenecientes a productos agrícolas y aguas de riego mediante la técnica de PCR que permita la diferenciación genotípica intraespecífica.

Objetivos específicos

- Realizar análisis de secuencias basado en el genoma de *Klebsiella* para evaluar oligonucleótidos como iniciadores en la técnica de PCR.
- Extraer ADN genómico de colonias de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae*.
- Aplicar la técnica de PCR para obtener amplificación fragmentos de muestras de ADN de *Klebsiella pneumoniae*.
- Aplicar la técnica de PCR para obtener amplificación fragmentos de muestras de ADN de *Klebsiella oxytoca*.
- Comparar los resultados de amplificación de fragmentos de ADN genómico de colonias de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae*.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

Poblaciones bacterianas en los recursos naturales de la provincia de Chimborazo. Aguas de riego

El agua destinada a la irrigación en la agricultura, se obtiene de diferentes medios como son ríos lagos o corrientes continuas de aguas naturales. JURECH es el sistema de riego que cubre más de 5000 hectáreas beneficia a más de 11000 usuarios que contribuyan a optimizar el uso del agua, conservar los suelos y garantizar eficiencia en la aplicación del riego de la provincia de Chimborazo ⁽¹²⁾. En el caso de la agricultura el riego de tierras cultivadas abarca el 16% en el mundo, siendo ellos los que producen el 40% de los alimentos ⁽¹³⁾.

Calidad del agua en productos agrícolas

La calidad del agua en la agricultura es importante para la obtención de altos rendimientos en productos agrícolas y comestibles. En estudios realizados demuestran que uno de los factores de contaminación de las aguas de riego de la provincia de Chimborazo es bacteriana, debido a la contaminación con heces humanas y animales, por el desconocimiento de los agricultores en la manipulación tanto en el momento del cultivo, la cosecha y en el lavado de los productos agrícolas resulta perjudicial tanto para el productor como para el consumidor ⁽¹⁴⁾.

Ríos contaminados de la provincia de Chimborazo

Las descargas de aguas residuales de unidades Educativas, Hospitales, Industrias y viviendas son los principales contaminantes en los ríos. La Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas (CESA) denomina como potencial mente contaminados el río Chambo, río Chibunga, río Guamote y Río Blanco ⁽¹⁴⁾. Demostraron la presencia de agentes patógenos en las muestras aisladas de los diferentes ríos.

El estudio realizado por Molina J y Orozco J determina que las muestras aisladas del Río Chambo contienen bacterias perjudiciales para la salud humana, siendo un total de once bacterias patógenas gramnegativas: enterobacterias (81,8%) entre estas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas* (18,2%) entre estas *Pseudomonas sp* ⁽⁸⁾.

Género *Klebsiella* spp

Von Frisch en 1881, fue el primero que menciono el género *Klebsiella* denominándole bacilo capsulado donde lo observo en pacientes con rinoescleroma. *Klebsiella* fue nombrado por Trevisan en honor al microbiólogo Edwin Klebs en 1885. Es una bacteria gramnegativa, inmóvil y anaerobia facultativa, por lo que puede habitar en diversos ambientes, tales como el agua, suelo, plantas, y mucosa, esta bacteria tiene la capacidad de formar parte de la flora normal en los seres humanos, en la mucosa del tracto digestivo y nasofaringe y son capaces de fijar nitrógeno ⁽¹⁵⁾.

Este género se subdividen en cinco especies (*K. ornithinolytica*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* y *K. pneumoniae*). Los miembros de este género presentan cápsula constituida de polisacáridos, lo que diferencia de las enterobacterias, *K. pneumoniae* también se caracteriza en disponerse en pares o en cortas cadenas. Las colonias de *Klebsiella* presentan características fenotípicas las que se desarrollan en agar MacConkey y se observan grandes mucoides de color rosado ⁽⁴⁾.

Variación Genética

La variación genética es un determinante biológico clave en la evolución de las especies y la base hereditaria del fenotipo, la misma proporcionar información sobre el rango funcional y las regiones críticas de un gen, proteína o elemento regulador. Las variantes genéticas pueden ser de naturaleza diversa, desde variantes por cambio de un solo nucleótido, pequeñas inserciones o deleciones, hasta variantes de gran número de copias.

La información sobre la variación genética anteriormente era limitada, pero en la actualidad hay una serie de estudios de variación genética a gran escala, que han generado abundantes datos sobre la variación común y está comenzando a surgir una imagen de las fuerzas impulsoras de la evolución y la diversificación de la población ⁽¹⁶⁾.

La tecnología de secuenciación se ha desarrollado con un mismo fin, que es el conocimiento a una nueva fase centrada del genoma individual y la divulgación completa de la variación individual de cada gen, lo que aporta de manera segura una identificación a mayor escala y con exactitud.

Por lo que en la actualidad se encuentran en gran magnitud de artículos científicos que se enfocan en la detección individual por genotipificación de las especies, tomando como

ejemplo la publicación de Bailón H. y Sacsquispe R. Donde manifiesta que la caracterización molecular de cepas de *K. pneumoniae* productoras de (BLEE) causantes de infección intrahospitalaria, que demuestran identificación y diferenciación entre cepas que aparentemente son iguales teniendo como resultados que los diversos reportes evidencian la existencia de clones internacionales o epidémicos de *K. pneumoniae* en todo el mundo; y algunas investigaciones han revelado la existencia de clones identificados por genotipos asociados con infecciones ⁽¹⁷⁾.

Tipos de Variación Genética

La variación genética tiende a considerarse de muchas formas, pero todas se originan a partir de solo dos tipos, el primero y variación más simple resulta de una simple sustitución de base el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), el segundo resultan de la inserción o eliminación de una sección de ADN ⁽¹⁸⁾.

Depósito de secuencias genómicas

Existen plataformas digitales que se encuentra disponible para todo el público donde se encuentran depositadas secuencias nucleotídicas definidas formalmente, las mismas que son presentadas de investigaciones por laboratorios individuales. El banco genómico GenBank fue establecido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) que presenta especies ya secuenciadas a nivel mundial ⁽¹⁹⁾.

El depósito de secuencias genómicas tiene como finalidad genotipificar y encontrar nuevas secuencias, presentado así variabilidad intraespecífica que demuestren cambios en la secuencia nucleotídica y confirmando los cambios evolutivos en las especies.

La validación de iniciadores como ensayos para la realización de la PCR como estudio de Cordeiro.R (2017) donde manifiesta que la construcción de los iniciadores a partir de una secuencia de referencia para el gen en estudio disponible en la plataforma GenBank ⁽²⁰⁾.

Identificación microbiológica de *Klebsiella*

Cultivo

En sus características fenotípicas su crecimiento se desarrolla a 37 °C y pH 7. Pueden crecer en ausencia o presencia de oxígeno, algunas pueden sobrevivir utilizando citrato y glucosa como fuente de carbono, y amonio como fuente de nitrógeno. Dentro de sus

características bioquímicas puede fermentar la lactosa y el manitol también reduce el nitrato a nitrito y es ureasa positiva, por otro lado, algunas especies son negativas tanto para indol como para ornitina, no producen ácido sulfhídrico y son positivas para el test del Rojo de Metilo y Voges-Proskauer⁽²¹⁾.

Las *Klebsiellas* pueden ser aisladas en muestras de sangre, orina, y en las mucosidades de nuestra cavidad bucal, desempeñan un importante papel para la detección, debido que es causante de enfermedades infecciosas oportunistas, ocupando el segundo lugar de las enterobacterias oportunistas⁽⁹⁾. Es la causante de infecciones nosocomiales y comunitarias, después de *Escherichia coli*, causando variedad de infecciones de gran virulencia en el medio urinario, abdominal y respiratorio.

Las técnicas moleculares facilitan una correcta identificación de la cepa problema y son imprescindibles para la comprensión de las infecciones nosocomiales.

Agar macconkey

Agar Macconkey es un medio de cultivo selectivo diferencial utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos gram negativo fermentadores y no fermentadores de lactosa. Se utiliza con frecuencia para el aislamiento de coliformes para la identificación de *Enterobacteriaceae*. Las muestras que pueden ser inoculadas son: heces, orina, aguas residuales y alimentos.

El medio contiene digerido pancreático de gelatina 17,0 g, digerido pancreático de caseína 1,5 g, de digerido péptico de tejido animal 1,5 g, lactosa 10,0 g, mezcla de sales biliares 1,5 g, cloruro de sodio 5,0 g, agar 13,5 g rojo neutro 30,0 mg, cristal violeta 1,0 mg y agua destilada 1.000 ml⁽²¹⁾.

Preparación

Suspender el medio en agua destilada y colocar en la plancha y agitando frecuentemente y dejar hervir hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos proceder a enfriar entre 45°C y 50°C, colocar 20 ml aproximadamente de medio por cada placa y esperar que se solidifique⁽²²⁾.

Extracción de ADN bacteriano

Una extracción de ADN con protocolos precisos que ayuda a tener una muestra exitosa íntegra y pura, la misma radica en el aislamiento del microorganismo y posteriormente la purificación de moléculas de ADN en diferentes estudios como describe Ríos.E.(2016), enfatizando que es necesario contar con una muestra libre de proteínas y de alta pureza para obtener resultados de calidad ⁽²³⁾.

Una extracción de ADN genómico es un paso crucial cuando se realiza estudios moleculares, existe variabilidad según el método de extracción utilizado, por lo que el mismo puede proporcionar contaminación residual con sales y solventes. El reactivo comercial DNAzol que indica que posee todos los amortiguadores y reactivos necesarios para realizar una extracción muy sencilla en corto tiempo y se obtiene material de alta pureza y peso molecular ⁽²⁴⁾.

Recuperación de ADN a partir de geles de agarosa

Recuperar y purificar fragmentos de ADN separados a partir de geles de agarosa y poliacrilamida, son técnicas que se han desarrollado con gran variedad de métodos. Uno de los primeros métodos fue desarrollado por Girvitz quien utilizó membranas de diálisis, esta técnica consiste en utilizar papel de DEAE-celulosa se puede aplicar en varias muestras simultáneamente este método posteriormente fue mejorado basándose en la unión del ADN a las membranas por interacciones electrostáticas, entre las cargas positivas en la membrana y las cargas negativas del ADN ⁽²⁵⁾.

McDonell en 1977 utilizó la técnica de electroelución (EE) esta técnica consiste en cortar el fragmento de gel que contiene el ADN para purificarlo, donde inicialmente se coloca en una bolsa de diálisis con un buffer, someter a un campo eléctrico para sacar el ADN y concentrarlo por precipitación. Estos métodos mencionados son una muestra de los diferentes que existen en el medio. Con el pasar del tiempo y las grandes casas comerciales han diseñado kits para procurar la recuperación de ADN y así disminuir tiempo y facilitar a los que realizan esta técnica en los diferentes laboratorios. ⁽²⁵⁾.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un ensayo de Biología Molecular donde se fundamenta en la amplificación en número de copias de un segmento de específico de ácido nucleico. Se realiza en un equipo llamado termociclador, que alterna temperaturas

altas y bajas, donde se utilizan varios reactivos entre las cuales una polimerasa que soporta temperaturas elevadas y se basa en las siguientes etapas.

1. **Pre desnaturalización:** Elevación de temperatura a 94°C por varios minutos, con el fin de activar la Taq polimerasa.
2. **Desnaturalización:** Luego de la separación del ácido nucleico molde pasa a ser una sola cadena de ADN con una temperatura requerida de 94°C.
3. **Hibridación:** Los iniciadores se unen a las cadenas del ADN molde que por medio de descenso en la temperatura produce el alineamiento. Generalmente la temperatura varía entre 40°C a 60°C. La Taq polimerasa se une al segmento de doble cadena, determinando una copia en sentido 5' a 3'.
4. **Extensión:** La polimerasa con estabilidad térmica añade los deoxinucleósido trifosfato (dNTP) a los extremos 3' de los dos cebadores hibridados de manera que se produce una replicación de la cadena a lo largo de la región comprendida entre los puntos de hibridación de los iniciadores incluyendo a éstos.

Estos constituyen un ciclo y son repetidos una y otra vez de 25 a 40 veces ⁽²⁶⁾.

La PCR es una técnica muy confiable y específica utilizada para diversos campos de estudio. Bailón.H y Sacaquispe R determinaron que el análisis visual de los resultados de PCR reveló la presencia de dos patrones de elementos genéticos repetitivos dentro de los siete aislamientos de *K. pneumoniae* analizados ⁽²⁾.

Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación

RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar)

Es una de las técnicas que consiste en la amplificación de segmentos de ADN con iniciadores pequeños, generalmente son decamérico (10 nucleótidos de longitud) de secuencias aleatorias. La secuencia del iniciador es elegida de manera arbitraria y sólo se utiliza un iniciador por reacción, que actuará en áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36°C) aseguran que se unen a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de DNA ⁽²⁷⁾.

Los fragmentos que se obtienen son separados por la técnica de electroforesis, realizando en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para visualizar como un patrón de

bandas característico del individuo y cada banda observada se considera un locus. La presencia o la ausencia de las bandas se deben a cambios en la secuencia. Es importante contar con controles positivos y negativos en cada una de las corridas, y realizar experimentaciones al momento de extraer ADN hasta la visualización fotodocumentador ⁽²⁷⁾.

El RAPD se utiliza para cuando no se cuenta con suficientes datos genómicos previamente publicados, o bien para las cuales se quiere obtener información genética de manera rápida y relativamente económica ⁽²⁷⁾.

Secuenciación del genoma

La secuenciación es una técnica que determina la secuencia completa de ADN en el genoma, la misma que ayuda a determinar los cuatro componentes químicos y en qué orden se disponen las bases, Adenina(A), Citosina(C), Guanina(G) y Timina(T) en un fragmento de ADN. Allan M y Walter G en 1977 diseñaron el primer método para secuenciar el ADN, en el mismo año se desarrolló el método enzimático de Sangre diseñado por Fred Sanger también conocido como método didesoxi o secuenciación por terminación de la cadena ⁽²⁸⁾.

Esta técnica ha cambiado la forma de pensar sobre la genética, determinando la identificación de las causas de la herencia e identificar un fenotipo definido para cada individuo, también ayuda a identificar variaciones producidas por factores genéticos, identificando la secuencia del gen que puede estar dañado a su vez la región que regula un gen que contiene cambios, llamados variantes o mutaciones ⁽²⁹⁾.

La secuenciación entre bacterias ayuda establecer las relaciones o diferencias filogenéticas existentes entre los organismos, permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias La amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro para posteriormente secuenciar, y así identificar bacterias que han conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos ⁽³⁰⁾.

Técnica para separar fragmentos de ADN

Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada en el laboratorio para separar fragmentos de ADN, ARN, moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Consiste en aplicar corriente eléctrica a través de un gel para separar moléculas, permitiendo que las moléculas se desplacen por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades ⁽³¹⁾.

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos tipos de electroforesis, pero para una mejor comprensión se ha organizado en dos fundamentales; electroforesis de zona y electroforesis de frente móvil. Actualmente la que mayor tiene uso es la electroforesis de zona donde emplea una fase sólida por donde se desplazaran las muestras depositadas entre ellas tenemos; papel filtro, celulosa, gel de agarosa o acrilamida ⁽³²⁾.

Gel de Agarosa

La agarosa es un polisacárido cuyas concentraciones frecuentes es de 0.5% a 2 % posee la propiedad de verse líquida, pero al contacto con temperaturas mayores a 50°C y al enfriarse toma una estructura semisólida que posee una estructura tridimensional de fibras poliméricas embebidas en gran cantidad de líquido que retrasan el paso de los ácidos nucleicos entre mayor sea la molécula mayor la dificultad de pasar ⁽³¹⁾.

Al poseer el gel de agarosa en su estructura semisólida en un molde adecuado se dejan unos huecos o pocillos donde se tiene que introducir la muestra, para así aplicar el campo eléctrico en la cámara de electroforesis, donde la fuerza impulsadora es directamente proporcional a la carga eléctrica dispuesta, el parámetro que rige es la relación carga/muestra ⁽³³⁾.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

Tipo de investigación

Descriptiva: describe la presencia de perfiles de bandas genéticas generadas por PCR, su tamaño y posición en un gel de electroforesis para interpretar y asociar a la especie bacteriana, lo cual sirve de identificación.

Diseño: No experimental: se aplicó el método de PCR basado en publicaciones relacionadas a la obtención de perfiles de bandas en bacterias *Klebsiella* motivo de este estudio. Por lo que, no es una propuesta de una nueva metodología, sino una aplicación de una ya existente para encontrar posibles variaciones de *Klebsiellas* basado en un patrón de bandas generados por PCR. No hay una manipulación de variables, se presentan los perfiles de bandas según resulten al aplicar la técnica.

Población: está constituida por catorce cepas de *Klebsiella* aisladas de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo, de las cuales 7 son *K. oxytoca* y 7 *K. pneumoniae* en las que se aplicó la técnica de PCR con primer aleatorio deca mérico.

Muestra: por ser un número finito de reacciones de PCR, el número muestras coincide con la población.

Variables:

Independiente: El ADN genómico de la *Klebsiella*

Dependiente: El patrón de bandas obtenidas del genoma bacteriano.

Métodos de estudio

Empírico: se realizó observaciones de las bandas de producto de la aplicación de la técnica de PCR

Procedimientos

Técnicas de Microbiología

Para contar con un stock de cepas bacterianas recién crioconservadas fue necesarias realizar una reactivación, para lo cual, se procedió a la preparación de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Oxytoca*, que gentilmente fueron provistas del semillero de investigación de la Universidad Nacional de Chimborazo por la DR. María del Carmen Cordobés donde se encargan del estudio de bacterias patógenas en aguas y productos agrícolas de la provincia de Chimborazo.

Tabla 1: Muestras provistas de *Klebsiella pneumoniae*

Lugar	Numero de muestra	Altitud	Temperatura ambiente	Origen de la muestra
San Luis	1.6.2		23°C	Brócoli
Puente Rumichaca Alausí	3.1.1(3)	2300	20°C	Lechuga Crespa
Puente Rumichaca Alausí	3.1.1Muc Peq	2300	20°C	Lechuga Crespa
Entrada a palmira	3.6.1	3080	18°C	Habas
Chipo Grande	5.1.1	3189	13.5°C	Agua
Chipo Grande	5.1.3	3189	13.5°C	Agua
Guamote	6.3.1B	3025	15°C	Papa Chaucha

Tabla 2: Muestras provistas de *Klebsiella oxytoca*.

Lugar	Numero de muestra	Altitud	Temperatura ambiente	Origen de la muestra
Cubijies	2.6.1	2479	19°C	Ocas
Cubijies	2.6.2	2479	19°C	Ocas
Puente Rumichaca Alausí	3.1.3	2300	20°C	Culantro
Puente Illibuchi Alausí	3.2.1Md	2340	19°C	Frutilla
Guamote	5.3.1	3025	15°C	Agua
Chipo Grande	6.1.1	3189	12°C	Choclo
Chipo Grande	6.1.2	3189	12°C	Papa Habas

Estas bacterias estaban adecuadamente crioconservadas, y para su reactivación consistió en:

1. Preparar Agar Macconkey en 8 placas bipetri.
2. Rotular y sembrar las 14 muestras bacterianas y 1 Control Positivo ATCC.

3. Esperar 24 horas y observar el crecimiento de las colonias.
4. En un matraz Erlenmeyer colocar 250ml de agua destilada y 7.5 g de medio TSB.
5. Colocar en la plancha hasta el punto de ebullición.
6. Proceder autoclavar por 25 min.
7. Esperar que el medio se encuentre temperatura ambiente.
8. Repartir en 15 matraces de 100ml uno para cada muestra respectiva de las Bacterias y 1 control positivo.
9. Inocular una colonia de cada una de las muestras bacterianas obtenidas en el numeral 3.
10. Dejar incubar a 37°C por 18 Horas.

Crioconservación de las bacterias

1. Colocar los matraces de cultivo en hielo durante 15 min.
2. Colocar el cultivo en tubos cónicos para centrifugar por 10 min a 3000rpm
3. Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no resuspender el precipitado bacteriano.
4. Agregar caldo de cultivo TSB recién preparado al precipitado bacteriano y centrifugar como en el numeral 2 y repetir el paso 3.
5. Repetir el paso 4 una vez más.
6. Añadir 10 ml de caldo TSB preparado con el 15% de glicerol a cada uno de los tubos de las diferentes cepas bacterianas.
7. Repartir 100µl en cada tubo de polipropileno de 1.5 ml, etiquetar y guardar en conservación a -20°C, para su posterior uso.

Análisis de secuencias basado en el genoma de *Klebsiella* para evaluar oligonucleótidos como iniciadores en la técnica de PCR

Para este proceso se analizó bibliografía en la que consta la utilización de iniciadores oligonucleotídicos para técnicas de PCR en el estudio de *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca*. Con esta información se procedió a la verificación en la base de datos Gene Bank del NCBI, destacándose el iniciador OPA 13 que posee la secuencia con el siguiente orden 5'... CAGCACCCAC ... 3' y por análisis por métodos bioinformático (uso de Blast) se encontró que 13 sitio se corresponden con la hibridación en la secuencia en el genoma de *Klebsiella*, además, se verificó el alineamiento en la cadena molde del ADN de la bacteria,

lo que permitió seleccionar al iniciador entre los demás analizados pues se observó que poseía gran utilidad para *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* en la producción de fragmentos aleatorios por PCR.

Extracción ADN genómico de colonias de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae*

Se desarrolló siguiendo el protocolo estandarizado indicado en el kit DNAzol que consta de la siguiente manera

1. Colocar 1000µl de DNAzol.
2. Colocar 100 µl de la suspensión de bacterias
Si se observa turbidez blanquecina o aspecto algodonoso, proceder al lavado
Opcional: Si no se observa la parte turbia, centrifugar alta revolución por un minuto y proceder al lavado.
3. Colocar 500 µl de etanol al 100% dejar incubar a temperatura ambiente por 3 min.
4. Trasladar 1000 µl de sobrenadante pipeteando o decantando.
5. Lavar el precipitado de ADN con 1000 µl de etanol al 75%. En cada lavado, suspenda el ADN en etanol invirtiendo los tubos de 3 a 6 veces. Almacene los tubos verticalmente durante 0.5-1 min para permitir que el ADN se asiente en el fondo de los tubos y elimine el etanol pipeteando o decantando.
6. Colocar 18.6 µl de 8 mM NaOH pH 7.2.
7. Etiquetar y conservar a -20°C.

Aplicación de la técnica de electroforesis para la observación de ADN

Para comprobar la calidad del ADN extraído se aplicó la técnica de electroforesis que consiste los siguientes pasos:

1. Preparar el gel de agarosa
 - Pesar en la balanza analítica 1g de agarosa y diluir en 50 ml de TAE1X.
 - Llevar a la plancha de calentamiento hasta la ebullición.
 - Dejar enfriar por unos 5 min aproximadamente.
 - Adicionar 7µl de BrEt 0,5 g/ml en el gel de agarosa.
2. Colocar en el molde que contiene la peineta para marcar los pocillos y esperamos que se solidifique.
3. Posteriormente en la cámara de electroforesis introducir 250 ml de TAE1X.
4. Introducir el molde con el gel y retirar la peineta.

5. Proceder a la preparación en una zona descontaminada que sea fácil el manejo de la pipeta, en esta ocasión utilizamos papel Parafilm.

Aplicación de la Técnica de PCR para obtener amplificación fragmentos de muestras de ADN Bacteriano

Preparación de reactivos para la PCR.

1. En un tubo de microcentrífuga agregar lo siguiente reactivos Buffer y Cl_2Mg , los Iniciadores, los nucleótidos o dNTPs, agua ultra pura y ADN polimerasa, basado en lo mostrado en la tabla 1.

Tabla 3: Detalle de reactivos para la PCR de las bacterias

Reactivos	Concentración del Stock	Concentración Final	Volumen por tubo (ul)	Master Mix para 9 tubos (ul)
H₂O Ultrapura			29,8	268,2
Buffer y Cl_2Mg	10x	1x	5	45
dNTPs	100mM	10mM	4	36
Iniciador	44.3mM	50pM	10	90
Polimerasa	5UI/ul	50U-ul	0,2	1.8
Muestra ADN bacteriano	-	-	1	-
Total			50	441

2. Agitando en un Vórtex durante 2-3 segundos e invirtiendo el tubo varias veces.
3. Para realizar la amplificación, colocar las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación establecidas en la tabla 2.

Tabla 4: Condiciones del termociclador para realizar la PCR en el ADN bacteriano

ETAPA	TIEMPO	T°C	CICLOS
Pre-desnaturalización	3min	94	1
Desnaturalización	1min	94	40
Hibridación	30seg	30	
Polimeración	2,5min	72	

Extensión final	3min	72	1
Conservación	∞	4	1

4. Tiempo aproximado en el termociclador 2horas 45 minutos.

Observación de perfiles de bandas.

Para observar los perfiles de bandas se aplicó la técnica de electroforesis, colocando 20µl como muestra los productos de amplificación de la PCR, el gel fue preparado al 2% con una migración a 100 V durante 1 hora. El procedimiento se puede observar en la página 12 en el protocolo para la técnica de electroforesis.

Comparación de los resultados de amplificación de fragmentos de ADN genómico de colonias de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae*.

Este análisis se realizó, colocando los productos de amplificación de PCR tanto de *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* en un mismo gel y se verifico la posición, tamaño y numero de bandas de ADN amplificado, para determinar diferencias o similitudes en el perfil de bandas genéticas obtenidas.

Consideraciones éticas.

No se hará uso de muestras biológicas humanas por lo tanto no se vulnera aspectos del respeto ético en las personas. Las cepas bacterianas serán manipuladas con estricto apego a las normas de bioseguridad lo que implica principalmente que serán eliminados los desechos luego de haber destruido su viabilidad por métodos esterilización por autoclave. Lo que resulta en el respeto al medio ambiente y a la población.

CAPÍTULO III:

RESULTADOS

Secuencia del iniciador para la técnica de PCR basado en el genoma de *Klebsiella* Diseño y Análisis de Iniciadores.

En la evaluación de oligonucleotidos como iniciadores en la técnica de PCR donde el ensayo realizado con el iniciador OPA 13 que posee la secuencia 5' .. CAGCACCCAC ... 3' fue seleccionado de un grupo de iniciadores analizados bibliográficamente que poseía gran especificidad en especie perteneciente a *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* resultando que por métodos bioinformático se obtuvo 13 locus con la secuencia.

```
TGCGCCCGGAGCTGGCGCCGGGGCAAAGCGCCTGGCGGTGCATTTGCGTAGCGAATAACTGGCTATCCC
GTCTTCGCCCCCGAGGACGGGTCAATTAACCGGCTCTCTCCAGTCCCAGCATGCCTCGCGCCTGGATAAA
GCACAGCAGCAATACGCCCCACAGCGCCATCGTCAGATAGGGGCTGATACCGAGGATATTGAACCCACTC
TCAATAATCTGCAGCAGGAACAGCGCGAGCACCATCCCAACGATGCGCCCGCTACCGCCATCCGGATTCA
CGCCGCCAAGCACC GCCGAGGATCGACACCAGCAAATACGATTCCCCATAAGATGCTTTGGCTGAGTT
CAGCTTCGACATCATCAGAAACGCGACCACCGCGCAGAGCAGGGCCGAGATGACATATACCCACATCAAC
ACCCGCCGGTATTGATCCCGGAATAATGGGTCGCCGTTCTGGTGGATCCGATCAACATGATCGCCCGAC
CCAGCGGGCTTTTCTCCAGCAGCACCCACAGCCCGGCCACCACCGCAAAAAGCCACATTGGCAGCGG
AATACCGAACCCTGGGCGTGATTCAGCCAAGCACCCACTGCGGATAGTTAGCGATGGCGTGCCCGCG
GTGATCAGAATATTTATCCCTTTGAGCAGGGTCATCATGCCAAGGGTAGCCAGGATCGGCGAAACGCGGA
TCCCGCGGATCAATATCCCGTTGCACAGGCCAATGATCATCGCCGCCCTCCGCCGGCCAGCAGCGTCGC
CAGCGCGGTAGCGCCCCAGGCGGATAGCTCGTCGCCACCAGGCCATCACCAGCGAGCAGGCGTTAGCC
GTCGCATAATTGACAAATTAATGCCCGCAAAGCATAGTCATGGCCATCGCCAGCGCCAGGATCCCCA
GCACCGGCATTTGCGAGGCAATCGACTGGAATTGCTGACAGACCAGAAGATGTTTGGCATGGCGATGCT
AAAGGCGATAACCATCAGCAGCAGCAGGCCGATCAGGTA AAACTCAACGTTATTGCGCCATGATTTTTTC
ATAACAAGCTCCGGTTCTGATGTGGCTCCATGCCGTTACGCTGATGCTGACGACGATGATCGCCCCAGT
GATCAGGATCTGCCAGTAGGAGGAGACCCTAGCAGGTT CAGGCCGTTCTGCATCACCGCCAGTAAAATC
```

Imagen 1: Secuencia de *Klebsiella pneumoniae* obtenida en la base de datos Gen Bank donde la secuencia seleccionada OPA 13 se encuentra subrayada y es el sitio blanco escogido sobre el cual se diseñó el iniciador.

ADN genómico de colonias de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae*

Electroforesis de ADN extraído pertenecientes a *Klebsiella pneumoniae*

En la siguiente imagen se observa la calidad de ADN extraído de *Klebsiella pneumoniae* con una migración a 100 V durante 1 hora.

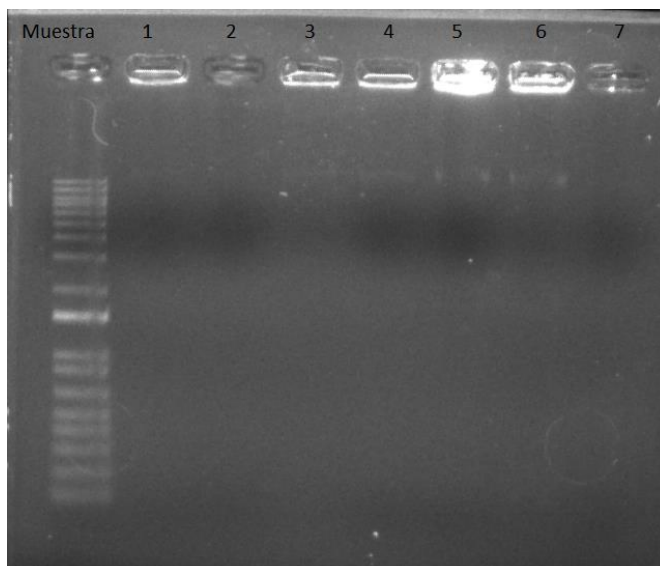


Imagen 2: Observación de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1% con un contenido de bromuro de etidio de 7 μ l con la siguiente disposición: Carril M, marcador de peso molecular (escalera de 1000 pb) carril 1 *K. pneumoniae* 1.6.2; carril 2 *K. pneumoniae* 3.1.1(3); carril 3 *K. pneumoniae* 3.6.1; carril 4, *K. pneumoniae*; Carril 5 *K. pneumoniae* 5.1.3 ; carril 6 *K. pneumoniae* 6.3.1 ; carril 7 *K. pneumoniae* 3.1.1, Muepeq; carril 8.

Electroforesis de ADN extraído pertenecientes *Klebsiella oxytoca*

En la siguiente imagen se observa la calidad de ADN extraído de *Klebsiella oxytoca* con una migración a 100 V durante 1 hora.

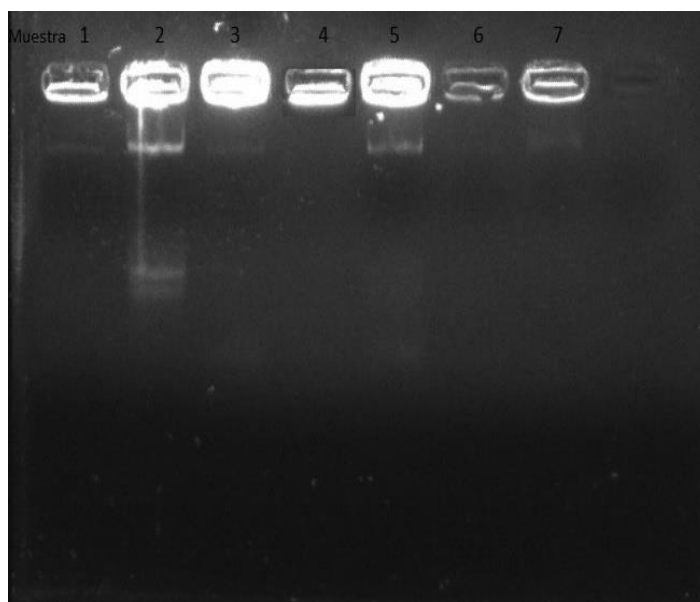


Imagen 3: Extractos de ADN productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con un contenido de bromuro de etidio de 7 μ l con la siguiente disposición carril 1 *K. oxytoca* 2.6.1; carril 2 *K. oxytoca*, 2.6.2; carril 3 *K. oxytoca* 3.1.3; carril 4, *K. oxytoca* 3.2.1; Carril 5 *K. oxytoca* 5.3.1; carril 6 *K. oxytoca* 6.1.1; carril 7 *K. oxytoca* 6.1.2.

Perfil de bandas genéticas de *Klebsiella pneumoniae* por técnica de PCR

Mediante la técnica de PCR se obtuvo amplificación de fragmentos de muestras de ADN de *Klebsiella pneumoniae*. Con un gel de agarosa al 2% y una migración a 100 V durante 1 hora

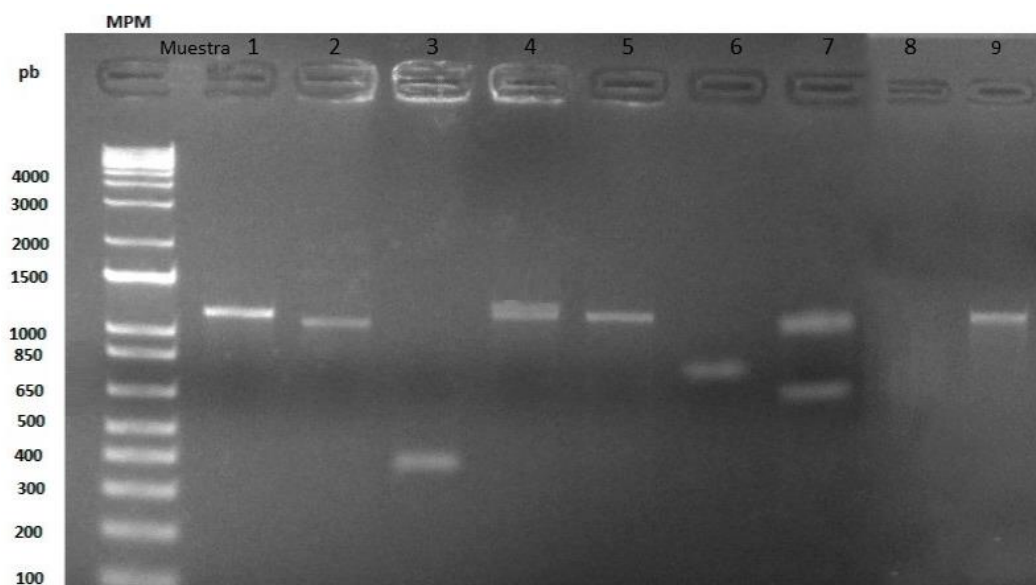


Imagen 4: Perfil de bandas de *Klebsiella pneumoniae* por PCR con Iniciadores OPA13, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con un contenido de bromuro de etidio de 7 μ l con la siguiente disposición: Carril M, marcador de peso molecular (escala de 1000 pb) carril 1 *K. pneumoniae* 1.6.2; carril 2 *K. pneumoniae*, 3.1.1(3); carril 3 *K. pneumoniae* 3.6.1; carril 4, *K. pneumoniae* 5.1.1; Carril 5 *K. pneumoniae* 5.1.3; carril 6 *K. pneumoniae* 6.3.1; carril 7 *K. pneumoniae* 3.1.1, Muepeq; carril 8 control negativo; carril 9, *K. pneumoniae* ATCC.

Tabla 5: Análisis visual de los resultados de PCR de *Klebsiella pneumoniae*

Lugar	Numero de muestra	Numero de bandas	Peso Molecular	Origen de la muestra
San Luis	1.6.2	1	1300pb	Brócoli
Puente Rumichaca Alausí	3.1.1(3)	1	1300pb	Lechuga Crespa
Puente Rumichaca Alausí	3.1.1Muc Peq	1	350pb	Lechuga Crespa
Entrada a palmira	3.6.1	1	1300pb	Habas
Chipo Grande	5.1.1	1	1300pb	Agua
Chipo Grande	5.1.3	1	650pb	Agua
Guamote	6.3.1B	2	1300pb- 500pb	Papa Chaucha
Control positivo	Carril N°9	1	1300pb	

Perfil de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca* por técnica de PCR

Mediante la técnica de PCR se obtuvo amplificación de fragmentos de muestras de ADN de *Klebsiella oxytoca*. Con un gel de agaroso al 2% y una migración a 100 V durante 1 hora

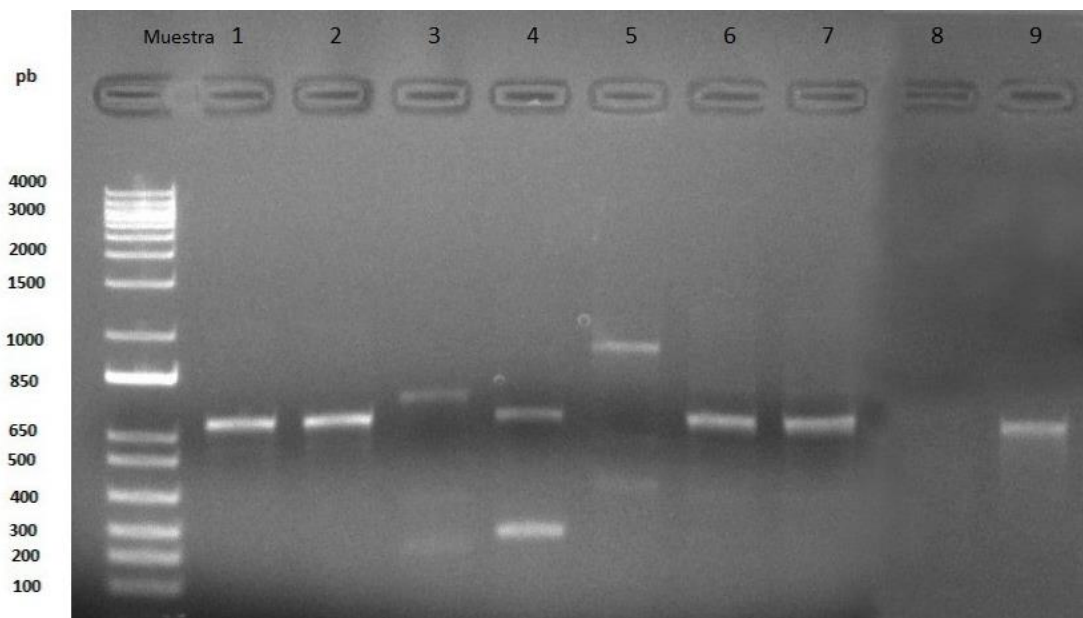


Imagen 5 : Perfil de bandas de *Klebsiella.oxytoca* por PCR con Iniciadores OPA13, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con un contenido de bromuro de etidio de 7µl con la siguiente disposición :Carril M, marcador de peso molecular (escalera de 1000 pb) carril 1 *K. oxytoca* 2.6.1; carril 2 *K oxytoca*, 2.6.2; carril 3 *K. oxytoca* 3.1.3; carril 4, *K. oxytoca* 3.2.1 ; Carril 5 *K. oxytoca* 5.3.1; carril 6 *K. oxytoca* 6.1.1 ; carril 7 *K. oxytoca* 6.1.2; carril 8 control negativo ; carril 9 , *K. oxytoca* ATCC.

Tabla 6: Análisis visual de los resultados de PCR de *Klebsiella oxytoca*

Lugar	Número de muestra	Número de bandas	Peso molecular	Origen de la muestra
Cubijies	2.6.1	1	650pb	Ocas
Cubijies	2.6.2	1	650pb	Ocas
Puente Rumichaca Alausí	3.1.3	3	700pb-400pb-200pb	Culantro
Puente Illibuchi Alausí	3.2.1Md	2	650pb-400pb	Frutilla
Guamote	5.3.1	2	950pb-400pb	Agua
Chipo Grande	6.1.1	1	650pb	Choclo
Chipo Grande	6.1.2	1	650pb	Papa Habas

Perfil de bandas genéticas entre *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

Klebsiella.oxytoca

Klebsiella.pneumoniae

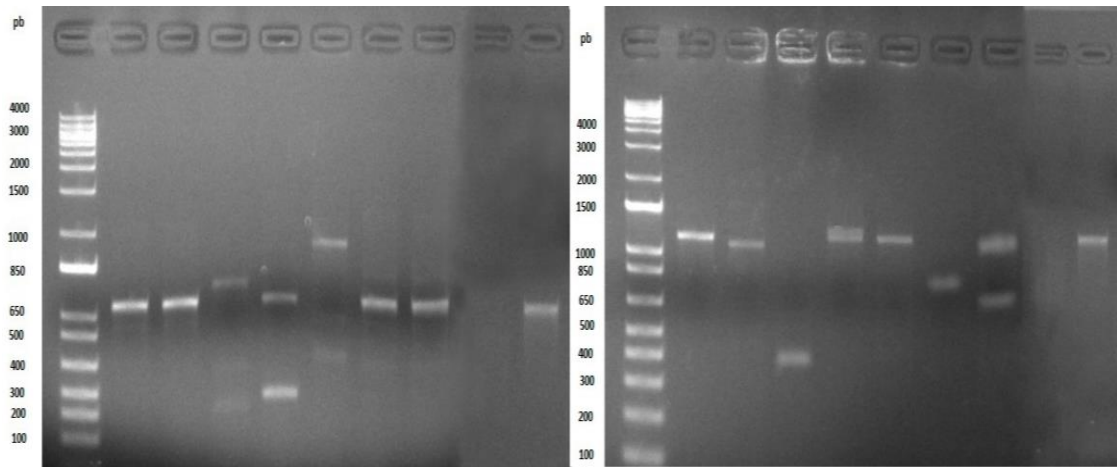


Imagen 6: Perfiles de bandas de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* por PCR con Iniciares OPA13, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con un contenido de bromuro de etidio de 7 μ l

Observando los resultados de PCR reveló la presencia de patrones totalmente distintos tanto en *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae*. Presentaron en su mayoría individualmente una banda patrón por su lado *Klebsiella oxytoca* presento un peso molecular de 600pb por otro lado *Klebsiella pneumoniae* su peso molecular en los 1300pb repetitivamente.

DISCUSIÓN

Los iniciadores decamericos han permitido amplificaciones aleatorias de fragmentos de ADN esto ha sido muy utilizado sobre todo para la identificación de especies constituyéndose como marcadores basados en perfiles genéticos que se observan en los geles de electroforesis. La variación a ese patrón de bandas de una misma especie seria el indicativo de variabilidad genética o lo que es lo mismo una nueva variante de la especie ⁽³⁴⁾. Los iniciadores OPA 13 particularmente han sido muy utilizados para estos casos, encantándose aquí también evidencias de variación según los resultados observados tanto para *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* bacteria patógenas de interés clínico que fueron obtenidas de diferentes sitios de la Provincia de Chimborazo

Estos resultados poseen relación con lo que sostienen Falco A y Barrios ⁽³⁵⁾. El Dr. Cubero M ⁽³⁴⁾. Benavides F, Bailón H y Sacsquispe R, Córdova I ^(36,37) , quienes también evidencian la existencia de variabilidad genética al identificar aislados de *K. pneumoniae* observándose aquí también variantes para *K oxytoca* .

La mayor parte de estos autores enfatizan las razones de la variación en los perfiles genéticos en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, por causa de mutaciones para la resistencia a antibióticos por producción de carbapenemasas tipo KPC. Además que los procedimientos bioquímicos no permiten evidenciar claramente las variaciones intraespecífica, por lo tanto se recomienda utilizar métodos moleculares para una correcta identificación sobre todo que *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* son motivo de preocupación por el creciente fracasos terapéuticos que han sido asociados a una reducida susceptibilidad a los antibióticos ⁽³⁸⁾.

En las muestras aisladas de este estudio de perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca* y *pneumoniae* estas fueron aisladas de productos agrícolas y aguas de riego, a diferencia de las muestras aisladas en las investigaciones hechas por Bailón H y Sacsquispe R que fueron muestras hospitalarias ⁽²⁾ y *Klebsiella pneumoniae* como una de las bacterias de interés clínico encontradas tanto en Perú como en Ecuador ⁽²¹⁾.

CONCLUSIÓN

- Los iniciadores para PCR fueron identificados mediante bibliografías destacándose el iniciador OPA 13, el mismo que posee gran especificidad para *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* observando un buen desempeño en el momento del desarrollo.
- En la extracción de ADN genómico se logró visualizar en el gel de agarosa por medio de la foto documentador una gran cantidad de ADN bacteriano.
- La amplificación de fragmentos de ADN de *Klebsiella pneumoniae* reveló los perfiles de bandas genéticas diferentes, se observó cuatro cepas con el mismo perfil de bandas con un peso molecular de 1300pb y tres cepas diferentes con pesos moleculares variables, la primera cepa poseía un peso molecular de 350pb, la segunda variante que se encontró tenía un peso molecular de 650pb y la tercera cepa tenía dos bandas con distintos pesos moleculares 500pb y 1300pb respectivamente. Esto manifestando la variabilidad dentro de la misma especie.
- La amplificación de fragmentos de ADN de *Klebsiella oxytoca* reveló los perfiles de bandas genéticas distintas, se observó cuatro cepas con el mismo perfil de bandas con un peso molecular de 650pb y tres cepas diferentes con pesos moleculares, la primera cepa poseía tres bandas con distintos pesos moleculares 200pb, 400pb y 700pb respectivamente, la segunda cepa que mostro variabilidad mostro dos bandas, la primera ubicada en 650pb y 400pb respectivamente, la tercera cepa mostro dos bandas, la primera ubicada en 400pb y 950pb respectivamente. Con esto se puede observar una variabilidad notoria dentro de la misma especie.
- Los perfiles de bandas de *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae* presentaron diferentes pesos moleculares. La banda que mayor repetición genero *Klebsiella oxytoca* está ubicada en las 660pb, por otro lado, *Klebsiella pneumoniae* genero su banda patrón ubicada en los 1300pb repetitivamente. Demostrando la diferencia en sus pesos moleculares y con ello una identificación intraespecífica de cada especie.

RECOMENDACIÓN

- Al determinar la variabilidad observada que presentan las cepas *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* es recomendable completar el análisis finalizando con una secuenciación del genoma de las bacterias descritas, ya que favorece la especificación del sub-tipo de gen que se está estudiando.
- Al realizar la PCR utilizar más de un iniciador para obtener mayor cantidad de fotodocumentación comparable entre las bacterias en estudio.
- Se sugiere continuar el análisis de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* para verificar la capacidad de resistencias en dichas bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guzmán-Orellana D. Bacilos Gram Negativos Productores De Carbapenemasas En Pacientes Hospitalizados en el Hospital Jose Carrasco Arteaga. Tesis. Cuenca: Universidad De Cuenca, Escuela De Medicina.
2. Henri-Bailón R. Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. *Rev Med Hered.* 2013; 24.
3. Ayala S, Valdiviezo B. Detección de serotipos capsulares K1, K2, K5 y genes de hipervirulencia magA. Tesis. Quito: Universidad Central del Ecuador, Bioquímica Clínica.
4. Puenayán E, Benavides F. Caracterización molecular del gen mgrB en *Klebsiella pneumoniae* productora. Tesis. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas.
5. Bailón H, Sacsquispe R. Diversidad genética de *Klebsiella* spp. Aislado de Tempe basado en Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Reacción en cadena de la polimerasa (ERIC-PCR). *Hayati Journal of Biosciences.* 2013; 20(4).
6. A V. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Scielo.* 2017; 34(5).
7. Valenzuela G. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *scielo.* 2015; 41(4).
8. Molina J, Orozco J. Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río. Tesis. Riobamba : Universidad Nacional de Chimborazo, Laboratorio Clínico e Histopatológico.
9. Reyes-Chacón J, Benavides-Puenayán E. Caracterización molecular del gen mgrB en *Klebsiella pneumoniae* productora. Tesis. Quito: Universidad Central Del Ecuador, Bioquímica Clínica.
10. González M. Epidemiología molecular, factores de virulencia. Universitat De Barcelona, Departamento de Patología y Terapéutica Experimental.
11. Hassan R. Random amplificó polimorfismo de ADN de *Klebsiella pneumoniae* aislados de la Universidad de Mansoura. *Academic Journals.* 2015; 09.
12. JURECH. *jurechgu.* [Online]; 2018. Acceso 10 de 09 de 2020. Disponible en: <http://www.jurechgu.org/ec/>.
13. Medina-Valdovinos E. Calidad del agua para riego y suelos agrícolas. .
14. Vela-Padilla J, Nogales-Quishpe E. Caracterización bacteriológica del agua del río Guano. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Ciencias de la Salud.
15. Paciel D, Seija V. *Infectologia.* [Online]; 2011. Acceso 04 de 12 de 2019. Disponible en: http://www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/publicaciones/biomedicas/tendencias/KPC_pacieletal.pdf.
16. Yauri F, Alcocer L, Rodríguez-Riglos M. Caracterización de la región variable de integrones clase 1 en aislados clínicos. *Revista Ecuatoriana De Medicina y Ciencias Biologicas.* 2016; 37(2).
17. Shaaban-Mona I. Random amplificó polimorfismo de ADN de *Klebsiella.* *Academic Jurnales.* 2015; 9(9).
18. Nirvia N. Variabilidad genética de *Klebsiella pneumoniae* con carbapenemasa tipo KPC proveniente de diferentes estados de Venezuela. *Elsevier.* 2019; 37(2).
19. Barnes M. Análisis de variación genética para investigadores biomédicos. Centro Nacional de Información Biotecnológica. 2015; 628(1).

- 20 Cordeiro-Lura J. Validación de indicadores y optimización de PCR. Tesis. Manaus: Universidad del estado de Amazonas, Ciencias Biologicas.
- 21 Cordova I. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de coresistencias en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae* KPC. Tesis. Quito: Universidad Católica, Bioquímico Clínico.
- 22 Felix-Murray K, Bolado-Martínez E. Caracterización Genotípica, Mediante ERIC-PCR, de Aislamientos Clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Tesis. Sonora: Universidad de Sonora, Químicos Biólogos.
- 23 Velázquez L, Alejos A. Extracción y purificación de ADN. Micrositios. 2014; 1.
- 24 Ríos-Sánchez E. Análisis comparativo de diferentes métodos. Acta Universitaria. Mexico: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas. ISSN.
- 25 C J. Comparación de métodos para la recuperación de ADN. Biomedica. 2015; 13(3).
- 26 Carrera D, Fonseca A. Identificación Diferenciación Molecular Por la Técnica de Reacción Cadena Polimerasa en sub Género de *Leishmania*. Tesis. Universidad de las Américas, Ingeniería y Ciencias Aplicadas.
- 27 Rocha-Munive M. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas. inec. 2015.
- 28 J M. Secuenciación del ADN. Biofisica. 2017; 1(2).
- 29 R S. Bioinfo. [Online].; 2018. Acceso 05 de 08 de 2020. Disponible en: http://vis.usal.es/rodrigo/documentos/bioinfo/temas/8_Secuenciacion%20de%20ADN.pdf.
- 30 G DR. CSIC. [Online].; 2016. Acceso 05 de 08 de 2020. Disponible en: <http://www2.iib.uam.es/seq/tecnicas/biomed1.htm>.
- 31 C P. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Proyecto. Universidad de Cordova, Bioquímica y Biología Molecular.
- 32 M A. NIH. [Online]; 2016. Acceso 05 de 08 de 2020. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>.
- 33 J R. Khan Academy. [Online]; 2015. Acceso 05 de 08 de 2020. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>.
- 34 González-Meritxell C. Epidemiología molecular, factores de virulencia. tesis doctoral. Barcelona: Universidad de Barcelona, Patología y Terapéutica Experimental.
- 35 Aura F, Yotsimar B. Epidemiología molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela. Scielo. 2017; 58(1).
- 36 Peñaherrera D, Córdoba I. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de coresistencias en cepas invasivas de *Klebsiella pneumoniae* KPC. Tesis. Quito: Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina.
- 37 Liu Y, Chao L, Wenjie Z, Qili I, Yanmei H, Xitai H. La detección por PCR de *Klebsiella pneumoniae* en fórmula infantil basada en 16S - 23S spacer interno. Elsevier. 2009.
- 38 Alós J. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Elsevier. 2014; 33(10).

ANEXOS

ANEXO 1: Constancia de la adquisición del iniciador y su secuencia

Invitrogen Custom Primers			
Certificate of Analysis			
Line 31 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 2/18/2020		Primer Number:	405558F03
Primer Name:	OPA13	Primer Length:	10
Researcher	BARAUZ	Scale of Synthesis:	50 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - CAG CAC CCA C		
Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$):	2,942.9	μg per OD:	28.82
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol):	102.1	nmoles per OD:	9.79
Purity	Desalt	OD's	4.53
% GC Content:	70	μg 's	130.47
T_m (1M Na+)	16	nmoles	44.3
T_m (50 mM Na+)	16		
Notes:			
Line 32 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 2/18/2020		Primer Number:	405558F04
Primer Name:	Pr1	Primer Length:	25
Researcher	BARAUZ	Scale of Synthesis:	50 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT GTT C		
Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$):	7,596.0	μg per OD:	30.26
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol):	251.0	nmoles per OD:	3.98
Purity	Desalt	OD's	9.17
% GC Content:	36	μg 's	277.33
T_m (1M Na+)	81	nmoles	36.5
T_m (50 mM Na+)	59		
Notes:			
Line 33 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 2/18/2020		Primer Number:	405558F05
Primer Name:	Pf_Pr2	Primer Length:	23
Researcher	BARAUZ	Scale of Synthesis:	50 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - CCG AAG ATG TTT CAC TTC TGA TT		
Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$):	7,005.6	μg per OD:	28.66
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol):	244.4	nmoles per OD:	4.09
Purity	Desalt	OD's	9.56
% GC Content:	39	μg 's	273.89
T_m (1M Na+)	81	nmoles	39.1
T_m (50 mM Na+)	60		
Notes:			

GUSTAVO VENEGAS


Order Number: 86415079

PO: GV-PRIMER-01-2020

Order Date: 18-Feb-2020

Page 1 of 5 (printed 2/19/2020 at 14:27:05)

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic procedures.



For information regarding COA calculations, primers use, and protocols, please go to www.invitrogen.com and click on Custom Primers.

ANEXO 2: Evidencias Fotográficas

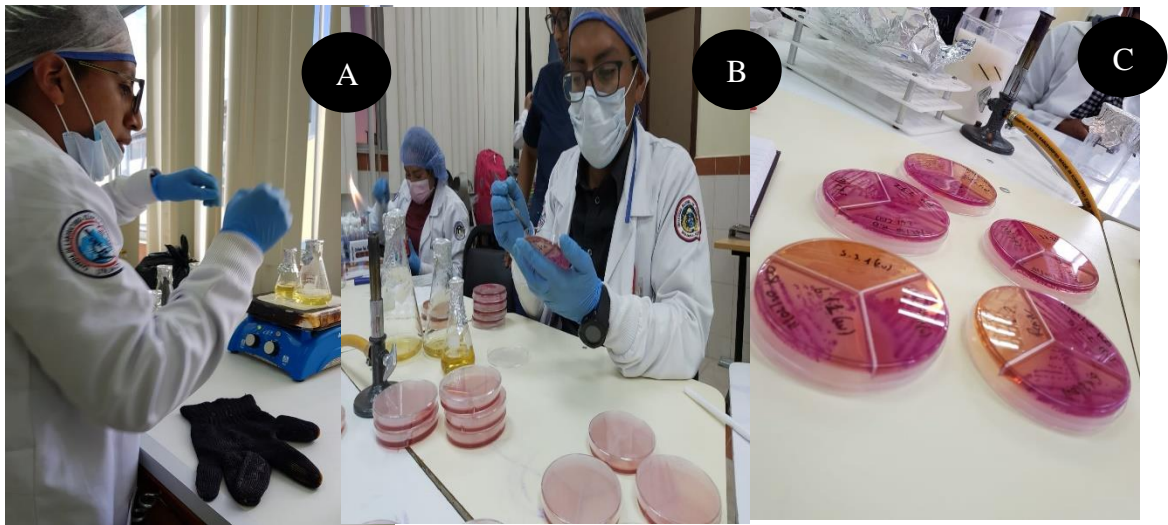


Imagen 8: Preparación de las muestras A) Preparación de agar TSB para inocular las bacterias y nutrirlas B) Cultivo de las bacterias en Agar MacConkey C) Resultado del crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca*

Elaborado por: Arauz López Favio Bladimir proyecto Perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca pneumoniae* de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo

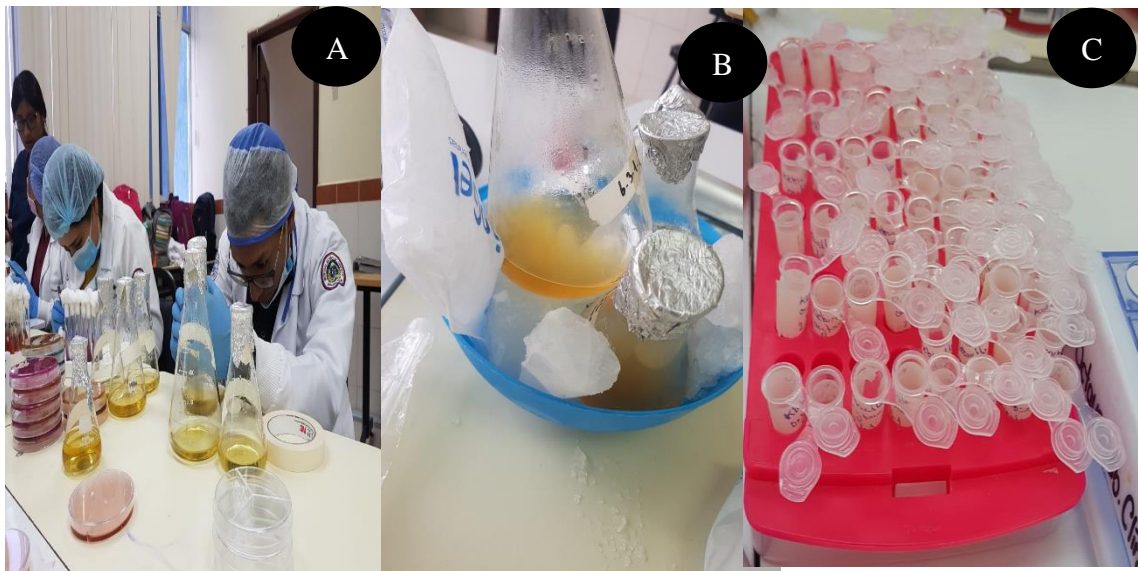


Imagen 9: Nutrición de las muestras para la criopreservación A) Verificación del crecimiento bacteriano B) extracción de bacterias para criopreservarlas C) microtubos codificados para criopreservarlos

Elaborado por: Arauz López Favio Bladimir Perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca pneumoniae* de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo

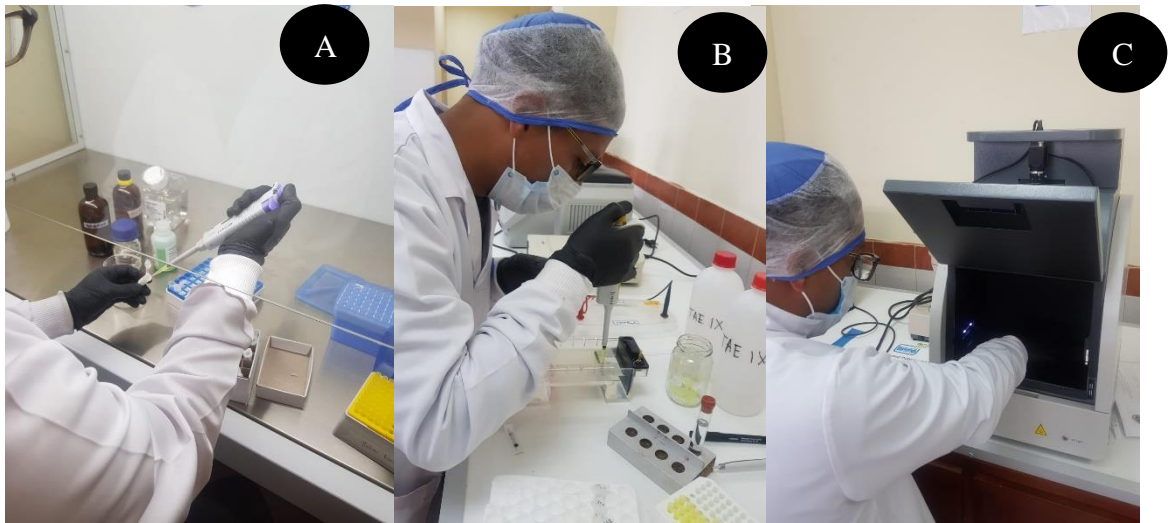


Imagen 9: Extracción de ADN A) Extracción de ADN con el reactivo DNAzol B) Depositando la muestra para verificar el ADN por electroforesis C) Colocando el gel de Agarosa en el revelador

Elaborado por: Arauz López Favio Bladimir Perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca pneumoniae* de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo



Imagen 10: Reacción en la cadena de la polimerasa PCR A) Preparación de los reactivos para realizar la PCR B) ubicación de las muestras en el termociclador C: preparación del gel de Agarosa

Elaborado por: Arauz López Favio Bladimir Perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca pneumoniae* de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo



Imagen 12: Deposito de muestras para el recorrido por electroforesis A) Deposito de las muestras en los pocillos del gel de agarosa B) Recorrido en la cámara de electroforesis C) revelado en el computador del gel de agarosa

Elaborado por: Arauz López Favio Bladimir Perfiles de bandas genéticas de *Klebsiella oxytoca pneumoniae* de productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo