



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TEMA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN
GENOTÍPICA DE *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca*
EN MUESTRAS REMITIDAS AL (CRN RAM) INSPI QUITO**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES: ESTALIN XAVIER LOJANO CASTILLO

JOSÉ DARIO QUISHPE CASA

TUTOR: VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito - Ecuador

2024

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, Estalin Xavier Lojano Castillo con documento de identificación N°1725449183 y

José Darío Quishpe Casa con documento de identificación N°1751229178; manifestamos que:

somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de

lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de

manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 6 de febrero del año 2024

Atentamente,



Estalin Xavier Lojano Castillo

1725449183



José Darío Quishpe Casa

1751229178

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Estalin Xavier Lojano Castillo con documento de identificación No. 1725449183 y José Darío Quishpe Casa con documento de identificación No. 1751229178, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Estandarización del método PCR para la identificación genotípica de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* en muestras remitidas al (CRN RAM) INSPI QUITO”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 6 de febrero del año 2024

Atentamente.



Estalin Xavier Lojano Castillo

1725449183



José Darío Quishpe Casa

1751229178

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Viviana Pamela Chiluisa Utreras con documento de identificación No. 1713168258, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* EN MUESTRAS REMITIDAS AL (CRN RAM) INSPI QUITO, realizado por Estalin Xavier Lojano Castillo con documento de identificación No. 1725449183 y por José Darío Quishpe Casa con documento de identificación No. 1751229178, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 6 de febrero del año 2024

Atentamente,



Viviana Pamela Chiluisa Utreras

1713168258

Dedicatoria

A mi familia y amigos, quienes no me dejaron caer, quienes estuvieron para verme aprender, crecer y vencer. Siempre formarán parte de mí.

¡Va por ustedes!

Dedicatoria

A mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos, con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades.

Agradecimiento

Agradecemos a las personas que formaron parte de nuestro crecimiento académico y quienes creyeron en nosotros al plasmar nuestro conocimiento en el desarrollo de este proyecto. A los miembros del Centro de Referencia Nacional de Resistencia Antimicrobiana en el INSPI, quienes nos guiaron en todo el proceso. A nuestra tutora, Msc. Viviana Chiluisa Utreras que estuvo presente aportándonos su conocimiento y experiencia, para que el proyecto avance de la mejor manera.

Todos ustedes son parte del profesional que forjamos.

RESUMEN

La multirresistencia bacteriana representa un serio problema para la salud pública a nivel nacional e internacional, por la patogenicidad presente en algunas enterobacterias y las repercusiones que pueden tener. El correcto manejo, control y tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos vienen precedidas de una eficiente identificación. Diversos estudios reportan dificultades en la diferenciación de especie pertenecientes a los géneros *Raoultella* y *Klebsiella*, debido a la similitud en características taxonómicas y filogenéticas que comparten. Los ensayos fenotípicos resultan insuficientes, por lo que se contrarresta la información con métodos genotípicos basados en la amplificación de regiones específicas.

El presente estudio propuso la estandarización de un protocolo de PCR para la identificación de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* basado en la detección de los genes *bla*, *hdc*, *pehX* en cepas provenientes de diversos centros hospitalarios que forman parte del sistema nacional de salud. Para ello se establecieron condiciones térmicas óptimas en PCR, concentraciones adecuadas de primers, y volúmenes de los componentes para la reacción. El protocolo fue capaz de identificar correctamente los microorganismos de interés en base a la amplificación de los genes *bla* y *hdc* en *Raoultella ornithinolytica*, *hdc* en *Raoultella planticola* y *pehX* en *Klebsiella oxytoca*. Las condiciones térmicas óptimas de amplificación fueron: Desnaturalización inicial por 5 minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto cada uno, extensión final a 72°C por 7 minutos y mantenimiento del ADN a 4°C de manera indefinida. La concentración óptima de primers para la reacción fue de 0.6µM.

Palabras clave: Multirresistencia, concentración, sensibilidad, dilución, especificidad.

ABSTRACT

Bacterial multidrug resistance represents a serious problem for public health at a national and international level, due to the pathogenicity present in some enterobacteria and the repercussions they may have. The correct management, control and treatment of infections caused by these microorganisms are preceded by efficient identification. Various studies report difficulties in differentiating species belonging to the genera *Raoultella* and *Klebsiella*, due to the similarity in taxonomic and phylogenetic characteristics that they share. Phenotypic assays are insufficient, so the information is counteracted with genotypic methods based on the amplification of specific regions.

The present study proposed the standardization of a PCR protocol for the identification of *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* and *Klebsiella oxytoca* based on the detection of the *bla*, *hdc*, *pehX* genes in strains from various hospital centers that are part of the national health system. For this, optimal thermal conditions were established in PCR, adequate concentrations of primers, and volumes of the components for the reaction.

The protocol was able to correctly identify the microorganisms of interest based on the amplification of the genes *bla* and *hdc* in *Raoultella ornithinolytica*, *hdc* in *Raoultella planticola* and *pehX* in *Klebsiella oxytoca*. The optimal thermal amplification conditions were: Initial denaturation for 5 minutes at 95 °C, followed by 30 cycles of: denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 1 minute each, final extension at 72°C for 7 minutes and maintenance of the DNA at 4°C indefinitely. The optimal concentration of primers for the reaction was 0.6µM.

Keywords: Multiresistance, concentration, sensitivity, dilution, specificity.

Índice de contenido

1	Introducción	1
2	Fundamentación Teórica	5
2.1	Microorganismos bacterianos.....	5
2.1.1	Características del Género <i>Klebsiella</i>	6
2.1.1.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6
2.1.2	Características del género <i>Raoultella</i>	7
2.1.2.1	<i>Raoultella Planticola</i>	8
2.1.2.2	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	8
2.2	Métodos de identificación bacteriana.....	9
2.2.1	Métodos fenotípicos de identificación bacteriana.....	10
2.2.1.1	Identificación por pruebas bioquímicas.....	10
2.2.2	Métodos moleculares de identificación bacteriana	13
2.2.2.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	14
2.2.2.1.1	Fundamento	14
2.2.2.1.2	Componentes para la PCR.....	15
2.2.2.1.2.1	Muestra de ADN.....	15
2.2.2.1.2.2	Polimerasa.....	15
2.2.2.1.2.3	Nucleótidos o dNTP's.....	15
2.2.2.1.2.4	Cloruro de magnesio (MgCl ₂).....	16
2.2.2.1.2.5	Solución tampón (buffer).....	16
2.2.2.1.2.6	Cebadores o primers	17
2.2.2.1.3	Etapas de la PCR	18

2.2.2.1.3.1	Fase de desnaturalización	18
2.2.2.1.3.2	Fase de Hibridación	18
2.2.2.1.3.3	Fase de extensión o elongación	18
2.2.2.2	<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	19
2.2.3	Genes de identificación molecular	21
2.2.3.1	<i>Gen bla (β-lactamasa)</i>	21
2.2.3.2	<i>Gen hdc (Histidina descarboxilasa)</i>	22
2.2.3.3	<i>Gen pehX (exo-poli-α-d-galacturonosidasa)</i>	22
2.3	Estandarización del método PCR	22
2.4	Especificidad	23
2.5	Sensibilidad	23
3	Materiales y métodos	25
3.1	Selección de cepas bacterianas.....	25
3.2	Reactivación de cepas bacterianas	25
3.3	Siembra de bacterias.....	25
3.4	Identificación Bioquímica	26
3.5	Estandarización del protocolo PCR.....	26
3.5.1	Extracción de ácidos nucleicos.....	26
3.5.2	Cuantificación de ADN	27
3.5.3	Determinación de gradientes	28
3.5.4	Primers para la identificación de las bacterias	29
3.5.4.1	<i>Gradiente de concentración de primers</i>	29
3.6	Electroforesis en gel de agarosa	30
3.6.1	Visualización de resultados	31

3.7	Evaluación de la capacidad diagnóstica PCR.....	32
3.7.1	Determinación de la especificidad de PCR.....	32
3.7.2	Determinación de la sensibilidad de PCR.....	32
4	Resultados y discusión.....	35
4.1	Selección de cepas Bacterianas.....	35
4.2	Identificación Bioquímica.....	35
4.3	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	37
4.4	Método molecular de identificación bacteriana.....	39
4.4.1	Protocolo óptimo para PCR.....	39
4.5	Optimización de las condiciones de amplificación PCR.....	41
4.5.1	Gradiente de concentración de primers.....	41
4.6	Evaluación de la capacidad diagnóstica del protocolo PCR.....	42
4.6.1	Determinación de especificidad.....	42
4.6.2	Determinación de sensibilidad.....	46
	Conclusiones.....	49
	Recomendaciones.....	50
	Bibliografía.....	51

Índice de figuras

Figura 1. <i>Klebsiella oxytoca</i>	7
Figura 2. <i>Raoultella Planticola</i>	8
Figura 3. <i>Raoultella ornithinolytica</i>	9
Figura 4. Etapas de la PCR.....	19
Figura 5. Diluciones seriadas	33
Figura 6. Productos de protocolo óptimo de PCR.....	39
Figura 7. Gradientes de concentración de primers	41
Figura 8. Ensayo de especificidad para la amplificación del gen <i>bla</i>	43
Figura 9. Ensayo de especificidad para la amplificación del gen <i>hdc</i>	44
Figura 10. Ensayo de especificidad para la amplificación del gen <i>pehX</i>	45
Figura 11. Ensayo de sensibilidad para la amplificación del gen <i>bla</i>	47
Figura 12. Ensayo de sensibilidad para la amplificación de gen <i>hdc</i>	48
Figura 13. Ensayo de sensibilidad para la amplificación del gen <i>pehX</i>	49

Índice de tablas

Tabla 1. Concentración de agarosa para separar moléculas de ADN lineal.....	20
Tabla 2. Protocolo del termociclador para ensayos PCR	28
Tabla 3. Volúmenes de componentes para prueba de protocolo térmico.....	29
Tabla 4. Primers para la identificación de las bacterias	29
Tabla 5. Volúmenes para determinación de concentración óptima de primers.....	30
Tabla 6. Expresión génica en microorganismos de interés	31
Tabla 7. Resultados de los 6 ensayos bioquímicos para la identificación fenotípica.....	36
Tabla 8. Concentración y pureza de ADN en cepas para ensayos de sensibilidad	38

Índice de anexos

Anexo 1. Planificación del Servicio de acompañamiento Técnico (SAT).....	60
Anexo 2. Codificación individual de las cepas utilizadas	65
Anexo 3. Valores de concentración y calidad de ADN por cuantificación.....	65
Anexo 4. Disposición de muestras en el gel en ensayo de especificidad.....	66
Anexo 5. Cepas destinadas a ensayos de especificidad.....	67

1 Introducción

La multirresistencia bacteriana representa un serio problema para la salud pública a nivel mundial. Según la revista *The lancet*, se estima que 1,27 millones de personas murieron a causa de bacterias multirresistentes en el año 2019, y el panorama a futuro no parece mejorar. Se estima que para el año 2050 la cifra de defunciones anuales ascienda a 50 millones de personas (Murray et al., 2022). La resistencia bacteriana es la pérdida de sensibilidad de una bacteria a un antibiótico al que, en un inicio era susceptible. Esto ha creado la necesidad de desarrollar medidas más efectivas para prevenir y controlar la propagación de cepas bacterianas con estas características (Silvia et al., 2020).

La patogenicidad de algunas enterobacterias en enfermedades humanas ha ganado más atención en los últimos años, específicamente con *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca*, microorganismos asociados a infecciones clínicas (Hajjar et al., 2020). Algunas de estas infecciones están vinculadas con la estancia intrahospitalaria (nosocomial) tanto en adultos como en recién nacidos, como las causadas por *Klebsiella Oxytoca* (Neog et al., 2021), o cistitis, una infección ubicada en el tracto urinario causada por *Raoultella planticola* (Olson et al., 2013) e infecciones gastrointestinales y hepatobiliares, siendo las más frecuentes aquellas provocadas por *Raoultella ornithinolytica* (Hajjar et al., 2020). Este tipo de casos no han recibido la debida vigilancia por la dificultad para caracterizarlas mediante métodos fenotípicos convencionales (Park et al., 2011).

La confusión entre los géneros *Raoultella* y *Klebsiella* para su identificación es un problema de interés clínico. Ambas bacterias pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, por ende, comparten características bioquímicas y filogenéticas que pueden generar complejidad en su identificación, manejo acción terapéutica a tomar frente las infecciones causadas por estos microorganismos (Farmer et al., 2021).

Los análisis filogenéticos basados en genes evolutivamente conservados han permitido establecer relaciones evolutivas entre estos 2 géneros bacterianos, en los cuales se evidencia una alta heterogeneidad genotípica y el carácter polifilético de algunas especies de enterobacterias (Arenas et al., 2009). Una reclasificación del género *Klebsiella* en el año 2001 basada en el análisis del gen 16S rARN y la posterior secuenciación el gen *rpoB* permitió establecer esta nueva reclasificación, en la que el género *Raoultella* pasa a formar un género independiente que abarca bacterias como *Raoultella terrigena*, *Raoultella planticola* y *Raoultella ornithinolytica* (Castillo et al., 2018).

El género *Raoultella* es un grupo de bacterias Gramnegativas. Son bacilos móviles con flagelos peritricos (flagelos alrededor de toda la célula) además de ser aeróbicas facultativas; crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Martínez et al., 2022). Se caracterizan por ocasionar infecciones relacionadas con catéteres intravenosos, pericarditis, sepsis, infecciones del tracto urinario, de piel y neumonía. Además, se considera un patógeno nosocomial emergente y a menudo se asocia a afecciones médicas subyacentes o procedimientos invasivos (Prada et al., 2021).

Klebsiella también es un género bien conocido de bacterias Gram negativas, donde algunas de estas cepas son componentes normales en la microbiota humana presentes principalmente en el tracto gastrointestinal y las vías respiratorias superiores. Sin embargo, ciertas cepas patogénicas de *Klebsiella* pueden causar enfermedades graves en humanos, incluyendo neumonía, infecciones del tracto urinario, sanguíneas y demás enfermedades infecciosas oportunistas, especialmente en personas con sistemas inmunológicos debilitados (Pintos et al., 2020).

Los métodos fenotípicos tradicionales comprenden técnicas de identificación bacteriana en microbiología. Permiten distinguir el agente etiológico causante del proceso infeccioso en los

pacientes para adaptar una terapia antimicrobiana efectiva. Se efectúan mediante el análisis de características cualitativas; morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas (Bou et al., 2011). Las pruebas bioquímicas son ensayos sumamente importantes para esta finalidad. Permiten caracterizar microorganismos mediante reacciones frente a determinados sustratos, únicas y específicas para cada bacteria, pero, en el caso de discriminación de bacterias de estos géneros, las pruebas bioquímicas no pueden diferenciarlos claramente, dando resultados no concluyentes (Park et al., 2011).

La técnica molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ayuda en el diagnóstico clínico de estas enfermedades al amplificar un poco de material genético de los microorganismos causantes para su análisis y detección. Esto se debe a su alto grado de sensibilidad y especificidad (Alejandro, 2019).

Mediante los ensayos moleculares propuestos, se plantea la amplificación de genes específicos de cada especie en base a los cebadores utilizados. *Raoultella ornithinolytica* amplificará los genes *bla* y *hdc*. *Raoultella planticola* únicamente el gen *hdc*, y *Klebsiella oxytoca* el gen *pehX* (Park et al., 2011).

El Instituto Nacional en Salud Pública (INSPI), mediante el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos – RAM es el encargado de darle seguimiento epidemiológico a las cepas bacterianas que son reportadas desde las unidades de salud a nivel nacional (INSPI, 2023). El estudio abarca cepas bacterianas crioconservadas recopiladas en un periodo comprendido entre 2020 y 2023, con una cantidad determinada de ejemplares bacterianos basados en la disponibilidad.

El objetivo de esta investigación es estandarizar el método de PCR para la identificación genotípica de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* en muestras

remitidas al (CRN-RAM) INSPI QUITO. Se propone desarrollar protocolos para la identificación de bacterias mediante la amplificación de los genes *bla*, *hdc* y *pehX*. Para ello se establecerán condiciones óptimas de amplificación, temperaturas de annealing y de extensión, tiempos de amplificación, concentración de reactivos para PCR. Esto se conseguirá mediante gradientes que delimiten un rango de experimentación. La validación del protocolo se realizará mediante la evaluación de la capacidad diagnóstica con ensayos de sensibilidad y especificidad.

2 Fundamentación Teórica

2.1 Microorganismos bacterianos

La microbiología comprende aquella rama de la biología encargada del estudio de las bacterias; un grupo de organismos unicelulares procariotas. Carecen de un núcleo celular delimitado por una membrana. No presentan organelos como mitocondrias, cloroplastos y otras estructuras que sí poseen células eucariotas características de organismos animales y vegetales. Esto le permite al material genético encontrarse disponible en el citoplasma de las bacterias (De Los Ángeles et al., 2017).

La identificación y diferenciación comienza con el análisis de características morfológicas, macroscópicas y microscópicas. La forma de la célula bacteriana permite organizarlas en cocos, bacilos o espirilos asimismo la estructura de su pared celular y su reacción en tinción de Gram las clasifica en Grampositivas y Gramnegativas, además del olor y pigmentación relacionados con los componentes de los medios en los que son sembrados. Estas propiedades comprenden elementos fundamentales en muchos algoritmos de identificación (Murray et al., 2005).

La clasificación de bacterias Grampositivas y negativas propuesta por Christian Gram en 1884 sigue siendo un método valioso en microbiología, ya que permite diferenciarlas en base a la estructura de la pared celular y el cómo reaccionan sus componentes ante diferentes colorantes, (Pírez & Mota, 2008). En este proceso, las bacterias se tiñen con cristal violeta y luego se lavan con alcohol o acetona, donde las bacterias Grampositivas retienen el cristal de color púrpura y se tiñen de color púrpura o azul oscuro, mientras que las bacterias Gramnegativas no retienen el cristal violeta y se tiñen con un agente de contraste, generalmente safranina, de rojo o rosa (Aguirre, 2012).

Las bacterias Gramnegativas comprenden un importante grupo de estudio al abarcar familias como Enterobacteriaceae, caracterizadas por englobar géneros de interés clínico como: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *Raoultella*. Pueden provocar infecciones graves en los hospitales por la propagación de infecciones por mecanismos de resistencia de los portadores (Mollinedo & Gonzáles, 2014).

2.1.1 Características del Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* está representado por bacterias Gramnegativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Tienen un recubrimiento compuesto principalmente por polisacáridos; un determinante importante de su patogenicidad (Bou et al., 2011).

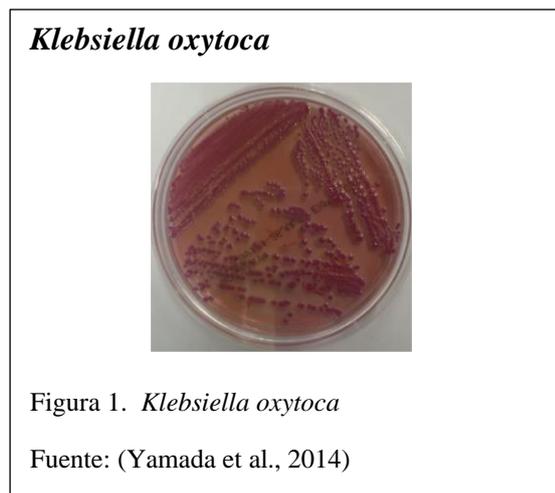
Las especies de *Klebsiella* son omnipresentes en la naturaleza debido a su excelente adaptabilidad a diferentes nichos ecológicos. Además de encontrarse en aguas residuales, suelos y plantas es un patógeno oportunista común en seres humanos y otros animales, colonizando las membranas mucosas de los mamíferos. La microflora bacteriana de la nasofaringe y el tracto gastrointestinal está predominada por ejemplares de este género (Brisse et al., 2004).

Estos microorganismos no tienen requisitos especiales de crecimiento, se cultivan en agar MacConkey a una temperatura óptima de 37°C y un pH neutro. Al ser bacterias anaeróbicas facultativas pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Muchas especies que componen este género pueden sobrevivir utilizando citrato y glucosa como fuente de carbono, y amoníaco como fuente de nitrógeno (Brisse et al., 2004).

2.1.1.1 *Klebsiella oxytoca*

Es una bacteria Gramnegativa de forma redonda con una pared celular compuesta por peptidoglicano y una membrana externa que contiene lipopolisacáridos, además forma colonias rosadas en agar MacConkey debido a la fermentación de lactosa. Tiene un alto grado de

similitud con *Klebsiella pneumoniae*, de la que se diferencia por su actividad indol positiva. Su principal factor de virulencia es una cápsula de polisacárido. Se considera un patógeno oportunista que causa infecciones del tracto urinario, respiratorio y sepsis, principalmente en pacientes frágiles y debilitados que ingresan a la unidad de cuidados intensivos (UCI) (Neog et al., 2021).



2.1.2 Características del género *Raoultella*

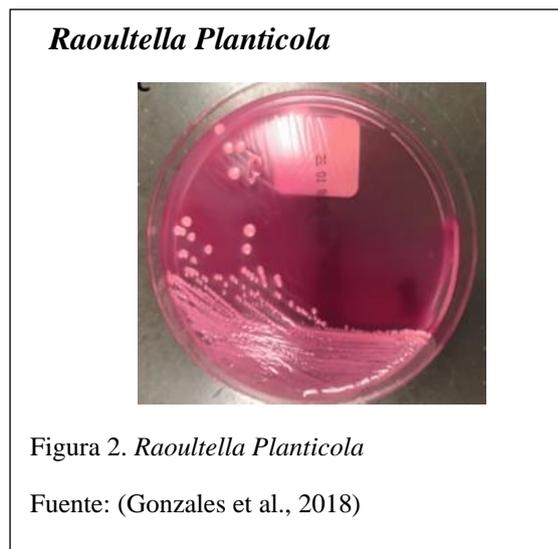
El género *Raoultella* son bacilos encapsulados, Gramnegativos y poseen oxidasa negativa, catalasa positivo, aeróbico, inmóvil, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. En 2001 se establece el género *Raoultella* y ejemplares de *Klebsiella* pasaron a formar parte de este nuevo género bacteriano, gracias a estudios filogenéticos como el análisis de secuencia de *16S rRNA* y *rpoB* el género *Klebsiella* se reclasificó en dos géneros diferentes. (Hajjar et al., 2020)

Los especímenes de este género habitan principalmente ambientes acuáticos e intrahospitalarios, y se asocian al envenenamiento por histamina en seres humanos con sistemas inmunológicos debilitados. Esto es posible debido a su capacidad de convertir la histidina en histamina y crear biopelículas en catéteres urinarios de pacientes en tratamiento. Sin embargo,

la patogenicidad de estas bacterias puede variar dependiendo de la especie y de otros factores (Castillo et al., 2018).

2.1.2.1 *Raoultella Planticola*

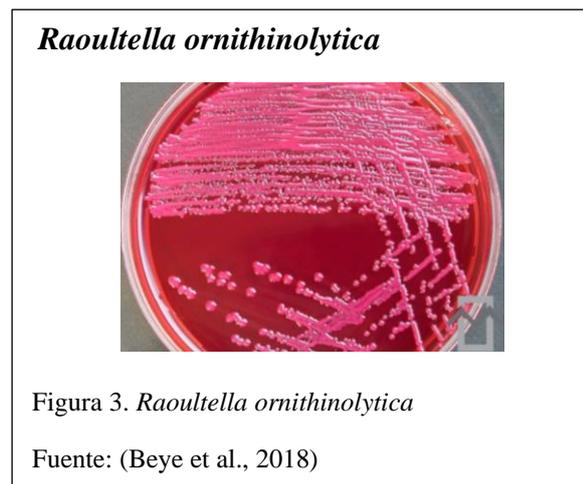
Posee morfología de bacilo y propiedades bioquímicas comúnmente evidenciadas en otros microorganismos Gramnegativos, como fermentación de glucosa, indol, citrato, urea positivos, y motilidad negativa (Lam & Salit, 2014). En varios países se han reportado infecciones causadas por *Raoultella planticola* y se han aislado cepas con genes que expresan betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas como principales agentes de infecciones humanas. Estos microorganismos son resistentes a la ampicilina debido a la sobreexpresión de la β -lactamasa tipo A. Además, se ha informado que las especies de *Raoultella* a menudo se confunden con especies de *Klebsiella* debido a las capacidades limitadas de diagnóstico en muchos laboratorios (Quintela, 2022).



2.1.2.2 *Raoultella ornithinolytica*

Raoultella ornithinolytica, anteriormente conocida como *Klebsiella ornithinolytica*, es un bacilo encapsulado, inmóvil, Gramnegativo que se encuentra en ambientes acuáticos, incluso

en suministros hospitalarios de agua potable. Los casos reportados de *Raoultella ornithinolytica* están en auge, pues cada vez hay un mayor índice de infecciones del tracto biliar y urinario relacionado con este microorganismo. Este aumento se debe principalmente a la dificultad para identificarlo con precisión utilizando métodos fenotípicos tradicionales, pues identifican a *Raoultella ornithinolytica* como *Klebsiella pneumoniae* o *Klebsiella oxytoca* (Hajjar et al., 2020).



2.2 Métodos de identificación bacteriana

Parte del trabajo y estudio microbiológico de rutina en los laboratorios enfocados en la epidemiología, es el de aplicar técnicas y ensayos fenotípicos que permitan la identificación del microorganismo patógeno, analizar su comportamiento frente a antimicrobianos específicos y establecer terapias que resulten eficaces para su control. La elección de la técnica tiene un gran impacto en la precisión de los resultados. Los métodos de identificación basados en el análisis fenotípico del microorganismo tienen un nivel inferior de exactitud que aquellos fundamentados en el análisis genotípico (Bou et al., 2011).

La determinación taxonómica de familias, géneros y especies bacterianas se realiza mediante diferentes ensayos que evalúan aspectos relacionados con la expresión de sus características

macroscópicas cualitativas (fenotípicos) así como el análisis de secuencias específicas en su material genético mediante métodos moleculares (genotípicos) (Giraldo et al., 2021).

2.2.1 Métodos fenotípicos de identificación bacteriana

Los protocolos tradicionales de fenotipado bacteriano se fundamentan en propiedades observables, como sus características morfológicas, de desarrollo, bioquímicas y metabólicas. El cultivo sigue siendo el método de diagnóstico predilecto cuando está disponible; permite el aislamiento e identificación de microorganismos, el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana y facilita el uso de marcadores epidemiológicos (Olmos et al., 2010). Dentro de sus ventajas frente a lo demás métodos de identificación resalta la homogeneidad de los resultados obtenidos, pero se ven limitados por un menor poder discriminatorio y reproducibilidad (Giraldo et al., 2021).

2.2.1.1 Identificación por pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son los sistemas fenotípicos más utilizados para identificar bacterianas en todo el mundo, pero con desventajas que restringen su efectividad, inestabilidad o influencia de factores ambientales al reaccionar los diferentes sustratos de estos medios. Además, presentan una limitación significativa en la precisión al reflejar la complejidad genómica de una especie determinada (Janda & Abbott, 2002).

Estos ensayos se caracterizan por presentar cambios observables cuando el microorganismo inoculado se desarrolla en el medio al encontrarse en condiciones ambientales óptimas. Los cambios pueden presentarse mediante coloración, turbidez o presencia de gas dependiendo de la prueba bioquímica que se aplique (Bou et al., 2011).

Dentro de los agares bioquímicos más importantes está el agar Triple Sugar Iron, ampliamente utilizado para la identificación de bacilos Gramnegativos entéricos fundamentados en la

presencia de 3 carbohidratos como fuente de energía para la proliferación del microorganismo; glucosa, lactosa y sacarosa. La fermentación de estos carbohidratos permite la diferenciación entre bacterias capaces de degradar estas moléculas en otras más simples (Valtek Diagnostics, 2017).

Está también el agar Lisina descarboxilasa (LIA), empleado para la distinción de enterobacterias en base a su capacidad para desaminar o descarboxilar lisina y producir sulfuro de hidrógeno. El citrato férrico de amonio y el tiosulfato de sodio intervienen como indicadores de la producción de H₂S (TM Media, 2019). Al descarboxilar la lisina se produce amina cadaverina, que alcaliniza el medio, permitiendo así reaccionar al indicador mostrando el característico color púrpura. Esta reacción ocurre en un entorno ácido, siendo necesario que la glucosa sea previamente fermentada. Las bacterias que no producen lisina descarboxilasa, pero que son fermentadores causan el cambio de color a amarillo. Transcurrido un periodo de 24 horas después de la incubación se aprecia el pico de color violeta a causa del consumo de las peptonas, con fondo amarillo en el medio (InsumoLab, 2018).

Otro agar de importancia microbiológica es el agar Simmons Citrato, un medio de cultivo diferencial para la identificación de bacilos Gram negativos en base a su capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono y el amonio como fuente de Nitrógeno. La degradación de las sales inorgánicas de amonio da como resultado la formación de iones amonio, que aumentan con la alcalinización del medio y producen así el cambio de color por parte del indicador, que varía de verde a azul (Biolife, 2023).

Por otro lado, el agar urea es usado para detectar la actividad ureasa del metabolismo bacteriano y diferenciar entre aquellas bacterias como *Proteus* del resto de las enterobacterias como *Klebsiella* o *Raoultella*. Esta diferenciación radica en que las especies de la familia

Enterobacteriaceae emplean la urea como única fuente de nitrógeno, siendo este medio capaz de suprimir la necesidad de las bacterias de utilizar subproductos de la urea, como el amoníaco como fuente de nitrógeno, permitiendo así detectar la hidrólisis de la urea. Los microorganismos que hidrolizan la urea se evidencian a través de un cambio de color en el agar, que se torna rosa o rojizo (MCD Lab, 2013).

El agar SIM (Sulfuro indol para movilidad) también es considerado un medio importante para la identificación de microorganismos, pues permite diferenciar bacilos entéricos en base a la producción de ácido sulfhídrico, indol y la movilidad en el agar. La naturaleza del ensayo permite apreciar la movilidad bacteriana a simple vista, siendo la turbidez el indicador de que la bacteria se diseminó a lo largo de todo el medio, mediante flagelos en su estructura. La ausencia de turbidez es indicativa de carencia en movilidad bacteriana. La formación positiva de indol se visualiza a través de coloración roja en la superficie del agar (MDM Científica, 2020).

Finalmente está el medio MRVP (Rojo de metilo y Voges Proskauer), caracterizado por permitir la diferenciación entre enterobacterias del género *Escherichia* y *Klebsiella* tomando como fundamento su reacción en un medio rico en dextrosa y peptona. Cepas de *Escherichia coli* producen una alta cantidad de ácido, mientras que en cepas de *Klebsiella aerogenes* la reacción es menos ácida. La detección de productores de altas cantidades de ácido se conoce como Rojo de metilo. La prueba para detectar a los productores de cantidades menores de ácido se conoce como Voges Proskauer, y se basa en la formación de acetilmetilcarbonil cuando se adiciona hidróxido de potasio en un medio aerobio, presentando un color rojo o rosa como indicador de resultado positivo (Ramírez et al., 2018).

Si bien las pruebas bioquímicas resultan de gran utilidad en muchas bacterias, se descubrió que, algunos de los microorganismos pertenecientes al género *Raoultella* y *Klebsiella* pueden identificarse erróneamente mediante los ensayos bioquímicos previamente detallados, pues métodos comerciales tienden a identificar a *Raoultella ornithinolytica* como si se tratase de *Klebsiella oxytoca* (Weber et al., 2010). Esta dificultad en la identificación fenotípica se debe a la naturaleza misma de las bacterias pertenecientes a ambos géneros. Si bien, taxonómicamente fueron desligados de pertenecer al mismo género, siguen formando parte de la misma familia; Enterobacteriaceae, y comparten características bioquímicas y filogenéticas que dificultan su identificación; como actividad ornitina descarboxilasa, producción de indol, utilización de diversos carbohidratos como fuentes de carbono, entre otras. (Drancourt et al., 2001).

En los problemas y dificultades de los métodos fenotípicos de identificación, no todas las cepas de una misma especie expresen características homogéneas, o que los patrones presentados por una misma cepa sean diferentes, aún en ensayos repetidos. Estas limitantes pueden traer repercusiones al momento de obtener y analizar resultados. Por eso la utilización de métodos moleculares han sido considerados ensayos complementarios o alternativos en la obtención de resultados verídicos (Bou et al., 2011).

2.2.2 Métodos moleculares de identificación bacteriana

Es importante contrastar la información obtenida de ensayos fenotípicos con métodos genotípicos que presenten un índice superior de precisión. Las técnicas moleculares como PCR, PFGE o secuenciación ofrecen ventajas sobre los métodos fenotípicos tradicionales, como un menor tiempo de obtención de resultados, alta especificidad y sensibilidad, la automatización del proceso, entre otros, que resultan las alternativas viables para emplear con regularidad (Giraldo et al., 2021).

Uno de los ensayos moleculares óptimos para esto es la PCR (Polymerase Chain Reaction), una técnica molecular que nos permite amplificar un o unas pocas copias de un fragmento de ADN y generar miles de millones de copias de una secuencia en específico mediante ciclos térmicos (Joshi & Deshpande, 2011).

2.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

2.2.2.1.1 Fundamento

La PCR (siglas en inglés de Polimerase Chain Reaction) es una técnica molecular desarrollada en la década de 1980 por Kary Mullis que revolucionó la biología molecular (Tamay et al., 2013). Se fundamenta en generar una reacción en cadena y producir millones de copias de una secuencia de ADN de manera exponencial a partir de un pequeño volumen de material genético. Esta amplificación se realiza mediante enzimas específicas; llamadas polimerasas, que pueden unir los bloques de construcción de ADN y formar cadenas moleculares. Esta reacción requiere de componentes esenciales que conformarán las nuevas cadenas; desoxirribonucleótidos trifosfatos: adenina, timina, guanina y citosina que serán incorporados a las cadenas tomando en cuenta un punto de partida referencial establecido por cebadores o primers; fragmentos cortos de nucleótidos de entre 15 a 25 pares de bases que flanquean y delimitan la secuencia blanco fragmento que se desea amplificar (Manzaba, 2019).

La técnica se convirtió en una herramienta fundamental en la investigación científica y en varias áreas de la biología, como la genética, la medicina y la biología forense. Permitiendo avances significativos en el diagnóstico de enfermedades genéticas, la identificación de patógenos y la investigación de la diversidad genética (Castillo, 2014).

2.2.2.1.2 Componentes para la PCR

2.2.2.1.2.1 Muestra de ADN

El ADN se utiliza como molde para la amplificación de la región de interés mediante la acción de los cebadores y la enzima Taq polimerasa. La muestra de ADN es fundamental en la PCR, ya que contiene la información genética que se desea amplificar y analizar, por ende, debe contar con un alto grado de pureza y estar libre de contaminantes que puedan interferir con la reacción de amplificación, como fenoles, sales, hidratos de carbono, entre otros (Proaño, 2019). Se requiere una concentración suficiente de ADN para que la reacción tenga éxito, de por lo menos 10ng/μL (BNA, 2020).

2.2.2.1.2.2 Polimerasa

Es una enzima que cataliza la síntesis de nuevas cadenas de ADN a partir de fragmento molde. Durante la PCR, la polimerasa se une a los cebadores (oligonucleótidos complementarios a la secuencia objetivo) y utiliza los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), para agregar nucleótidos complementarios a la plantilla de ADN, generando así nuevas cadenas del fragmento de interés (Carrasco, 2022).

La polimerasa más utilizada para este ensayo es la Taq ADN polimerasa; enzima proveniente de *Thermus aquaticus*; bacteria termófila que vive en condiciones térmicas muy altas (80°C). Gracias a esto, su polimerasa en particular mantiene la funcionalidad a temperaturas de esta índole (Tamay de Dios et al., 2013).

2.2.2.1.2.3 Nucleótidos o dNTP's

Son los componentes fundamentales del ADN durante la replicación. Están formados por una base nitrogenada (adenina, timina, citosina o guanina), un azúcar (desoxirribosa) y tres grupos

fosfato. Durante la síntesis de las nuevas cadenas, la polimerasa utiliza los dNTP's y los incorpora a la cadena de ADN en síntesis (Soler, 2009).

Los desoxirribonucleótidos trifosfato son factores importantes que están involucrados en la especificidad de la reacción, por ende, es relevante que su concentración sea óptima, ya que, de no ser el caso puede tener incidencia negativa en la funcionalidad de la Taq ADN polimerasa. Las concentraciones usuales que se utilizan varían entre 0,2 a 1,0mM (Tamay de Dios et al., 2013)

2.2.2.1.2.4 Cloruro de magnesio (MgCl₂)

Es un cofactor indispensable en la actividad enzimática de la polimerasa y se utiliza como fuente de iones magnesio (Bolívar et al., 2014). La concentración de MgCl₂ debe establecerse de manera experimental para cada polimerasa, secuencia blanco y primer. Una concentración muy baja o demasiado alta puede reducir la eficiencia del ensayo o amplificar secuencias de manera inespecífica, respectivamente. La concentración de magnesio libre en el tubo de reacción disminuye de manera proporcional con la concentración de agentes quelantes, como el EDTA (Dorado, 2014). La mayoría de los fabricantes incluyen una solución de MgCl₂ junto con la ADN polimerasa (Beltrán et al., 2013).

2.2.2.1.2.5 Solución tampón (buffer)

Es una solución amortiguadora que mantiene el pH apropiado para la actividad de la ADN polimerasa. Usualmente contiene Tris-HCl a un pH de 8,4 a temperatura ambiente, cloruro de potasio (KCL), gelatina y MgCl₂ (Bolívar et al., 2014). Los buffers son necesarios para proporcionar un ambiente óptimo para la actividad de la ADN polimerasa durante la PCR, asegurando la eficiencia y especificidad de la amplificación, por eso se debe considerar

cuidadosamente la concentración y composición del tampón, mismos que pueden variar según el protocolo de PCR utilizado (Lorenz, 2012).

Se recomienda también el uso de coadyuvantes para establecer un índice óptimo de especificidad en la reacción. Entre algunos de los coadyuvantes más utilizados están: dimetilsulfóxido (DMSO) usado para evitar la presencia de estructuras secundarias durante la amplificación, detergentes como Tween 20 capaces de estabilizar la polimerasa, polietilenglicol (PEG) y albúmina de suero (Bolívar et al., 2014).

2.2.2.1.2.6 Cebadores o primers

Son oligonucleótidos de cadena sencilla diseñados para ser complementarios con la secuencia de ADN blanco. La posición de los cebadores a lo largo de la cadena monocatenaria determina la longitud del producto de amplificación generado. Estos componentes proporcionan los extremos 3' hidroxilo que, al ser reconocidos por la polimerasa permiten el inicio de la reacción. Son cadenas cortas de 18 a 22 nucleótidos, con un contenido de GC del 40 al 75% (Bolívar et al., 2014). Es necesario que ambos cebadores cuenten con la misma temperatura de fusión (T_m), estarán situados al inicio y al final de la región diana delimitando así el sitio de acción de la enzima polimerasa y deben carecer de estructuras secundarias, ni complementariedad entre sí. Son el factor más sensible que determina el éxito de un ensayo (Proaño, 2019).

Los primers son los principales determinantes de la especificidad en la PCR, pues, para amplificar la secuencia específica se debe conocer la secuencia de los sitios de hibridación del cebador en el ADN de interés. Además, para evitar la unión de cebadores en sitios no específicos o su unión a secuencias similares en otra parte de la secuencia diana su diseño se delimita a esta cantidad de pares de bases (18 a 22) (Van Pelt-Verkuil et al., 2008).

2.2.2.1.3 Etapas de la PCR

2.2.2.1.3.1 Fase de desnaturalización

Durante esta etapa, la muestra de ADN se calienta a una temperatura alta, generalmente alrededor de 94-95 °C durante 1-5 min. Esta temperatura elevada rompe los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras de ADN, lo que resulta en la separación de las cadenas de ADN y la formación de hebras de ADN de cadena sencilla que servirán como moldes para la amplificación (Cárdenas, 2016).

2.2.2.1.3.2 Fase de Hibridación

Durante esta fase, la temperatura se reduce a un rango específico, generalmente entre 50 y 65°C, dependiendo de la secuencia de los cebadores utilizados. En esta etapa, los cebadores se unen o hibridan a las secuencias objetivo que están presentes en las hebras de ADN de cadena sencilla generadas durante la desnaturalización (Carrasco, 2022).

Una vez que los cebadores se han unido a las secuencias, se crea una estructura de doble cadena parcial, donde los cebadores están unidos a las hebras de ADN de cadena sencilla. Esta estructura de doble cadena parcial sirve como punto de partida para la siguiente etapa de la PCR; la extensión o síntesis de ADN (Carrasco, 2022).

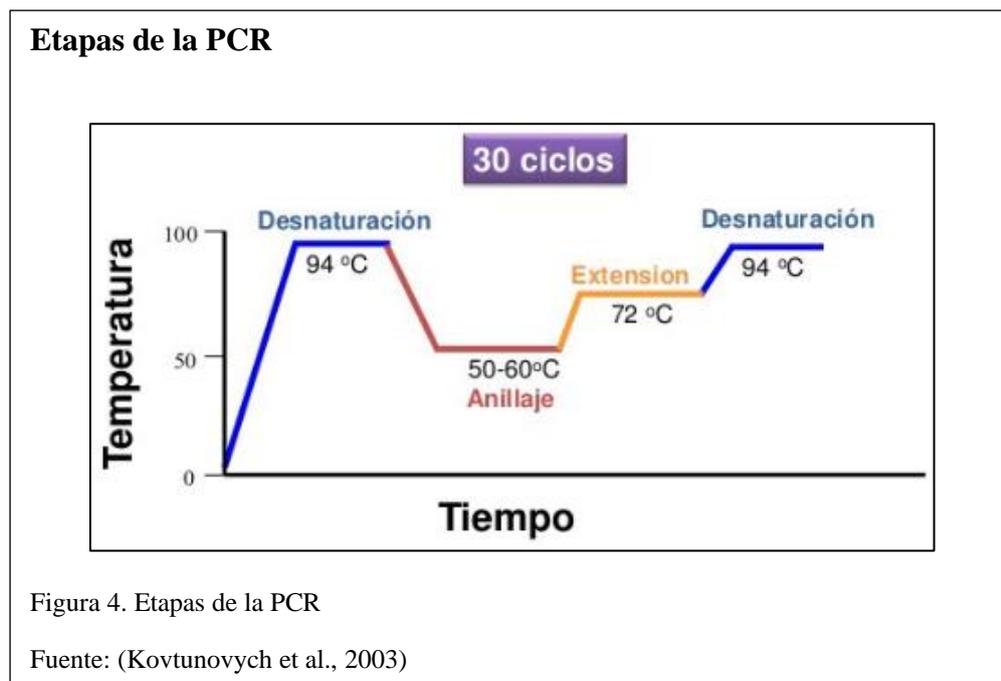
2.2.2.1.3.3 Fase de extensión o elongación

Es la etapa en la que la enzima polimerasa sintetiza una nueva cadena complementaria de ADN utilizando los cebadores como punto de partida. Durante esta fase, la polimerasa añade nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en la que se encuentra el cebador. La temperatura óptima para esta etapa depende de la polimerasa utilizada. Por ejemplo, para la polimerasa *Taq*, la temperatura de máxima actividad está generalmente alrededor de 72

°C. El tiempo de extensión varía según la polimerasa y la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Como regla general, a la temperatura óptima, la polimerasa de ADN puede sintetizar alrededor de mil bases en un minuto. La fase de extensión es esencial para la amplificación del ADN durante la PCR, ya que permite la síntesis de una nueva cadena complementaria a partir de la cadena molde (Cárdenas, 2016).

Todas las fases de la PCR se dan en el termociclador, equipo automático programable que permite calentar o enfriar el tubo de reacción amplificado por la muestra, controlando la temperatura y tiempo empleado en cada ciclo (Palma, 2010)

La amplificación y visualización de determinados genes permitirán la diferenciación entre las 3 especies bacterianas de interés epidemiológico: *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca*. Estandarizar un protocolo brindará una correcta y rápida identificación para su posterior manejo y control (Park et al., 2011).



2.2.2.2 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es una técnica utilizada para la verificación de los resultados del proceso de PCR, se utiliza agarosa como polímero capaz de formar fibras helicoidales, que una vez solidificadas crean canales por donde migra el ADN. Existen diferentes agarosas disponibles en el mercado que varían según el parámetro aplicado, principalmente la temperatura a la cual se solidifican (Quintero et al., 2017). Uno de los factores más importante es su concentración; de esta dependerá la distancia que recorrerán las bandas en el gel de agarosa y la longitud a la que estarán separadas unas bandas de otras después de concluya el tiempo establecido en el protocolo utilizado. Es así como se han establecido concentraciones de agarosa necesarias para la migración de secuencias de ADN en función de su tamaño, como se puede ver en la tabla 1 . (Pérez & Miryam, 2018).

Tabla 1. Concentración de agarosa para separar moléculas de ADN lineal

% de agarosa	Tamaño de la secuencia (pb)
0,75	10000-15000
1	500-10000
1,25	300-5000
1,5	200-4000
2	100-2500
2,5	50-1000

Nota: (Pérez & Miryam, 2018).

Las moléculas cargadas y ionizadas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo con carga opuesta cuando se aplica un campo eléctrico. Las moléculas de ADN, cargadas negativamente debido a los grupos fosfato en su estructura migran hacia el ánodo y las partículas cargadas positivamente hacia el cátodo, donde ocurre la separación de los fragmentos

de ADN, los fragmentos más pequeños serán los primeros en migrar, recorriendo una longitud mayor en el gel de agarosa, mientras que la distancia recorrida por los fragmentos más grandes será menor (Yábar, 2003).

Para que esto suceda se utiliza una suspensión buffer, empleada para la preparación del gel, como el TAE (Tris-Acetato EDTA) que consta de tres componentes: Tris, que actúa como tampón y mantiene un pH constante, ácido acético, que ayuda a mantener la carga negativa de las moléculas de ácido nucleico y EDTA, que posee iones de magnesio evitando que se unan a los ácidos nucleicos, lo que dificulta el movimiento de las moléculas en el gel (Rodríguez, 2004).

El TAE funciona mejor para tiempos prolongados, así se evita la acidificación del medio, además el buffer debe poseer una densidad considerable, permitiendo que la muestra a analizar sea introducida en los pocillos formados en el gel (Rodríguez, 2004).

Para la visualización de los resultados de la amplificación se emplea un foto documentador; cámaras capaces de emitir luz ultravioleta que excitará la molécula intercalante unida al ADN de doble cadena. Esta reacción lumínica emite una señal que permite la visualización de los productos de la amplificación en forma de bandas (Tamay de Dios et al., 2013).

2.2.3 Genes de identificación molecular

2.2.3.1 Gen *bla* (β -lactamasa)

Caracterizado por tener un peso molecular de 1121 pb está asociado a la identificación de *Raoultella ornithinolytica*. Este gen expresa β -lactamasa; enzima que otorga resistencia a los antibióticos de uso común e implica comorbilidades como: neoplasias malignas, traumatismos y procedimientos invasivos, así como infecciones relacionadas con el tracto biliar y la piel, además de neumonía intrahospitalaria. En cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos, se han

reportado diferentes variantes de resistencias que pueden estar relacionadas con el gen *bla* y confieren resistencia a los betalactámicos, ciprofloxacino y cotrimoxazol (Nakasone et al., 2015).

2.2.3.2 Gen *hdc* (Histidina descarboxilasa)

Gen característico de las cepas de *Raoultella planticola* y *Raoultella ornithinolytica*, posee un peso molecular de 742pb y codifica la enzima histidina descarboxilasa, que cataliza la conversión del aminoácido L-histidina en histamina; un tipo de amina vasoactiva que desempeña un papel en la respuesta inflamatoria del sistema inmunitario (Abiuso et al., 2017).

La síntesis de histamina a partir de la L-histidina es catalizada por la histidina descarboxilasa, y requiere fosfato de piridoxal como cofactor. Por lo tanto, el gen *hdc* está directamente relacionado con la síntesis de histamina a través de la actividad de la enzima histidina descarboxilasa (Kanki et al., 2002).

2.2.3.3 Gen *pehX* (exo-poli- α -D-galacturonosidasa)

El gen *pehX* se identificó en *Klebsiella oxytoca*, una especie estrechamente relacionada con *Raoultella planticola*. Posee un peso molecular de 344 pb, que divide una cadena poligalacturónica de pectina desmetoxilada. Esta enzima se utiliza como marcador para distinguir *Klebsiella oxytoca* de otras especies de *Klebsiella* (Kovtunovych et al., 2003).

2.3 Estandarización del método PCR

Cada protocolo de PCR resulta eficaz para la amplificación de determinadas regiones en base a diferentes variables. Cada parámetro influye en la efectividad de la amplificación del gen de interés, y es en base a la experimentación de sus variables que se logra conseguir un protocolo eficiente. Dentro de estos parámetros se encuentra la mezcla de la reacción y todos aquellos componentes como Taq polimerasa, dNTP's, buffer, primers, agua y el ADN molde cuyos

volúmenes y concentraciones pueden resultar en el éxito o fracaso de la reacción (Bolívar et al., 2014).

Los ciclos térmicos son fundamentales en el proceso, pues permiten a los elementos de la PCR reaccionar adecuadamente para que el proceso de amplificación ocurra, por eso el planteamiento de gradientes térmicos para cada ciclo puede ser útil al establecer un protocolo térmico para el termociclador (Espinosa, 2007).

2.4 Especificidad

Los ensayos de especificidad en PCR corroborarán que el protocolo propuesto amplifica los genes de interés solo de los microorganismos planteados. Esto se consigue ejecutándolo en diferentes cepas de diferentes microorganismos que puedan compartir ciertas características taxonómica, siendo la ausencia de amplicones la evidencia de que el protocolo resulta específico para las cepas de estudio (Vizcaíno, 2017).

La especificidad de la PCR depende de los ciclos térmicos establecidos en la fase de hibridación y de la cantidad de iones divalentes añadidos a la reacción. Esto se debe a que, mientras mayor sea la temperatura empleada en esta fase más específica será la reacción, pues, en las temperaturas altas en fase de hibridación los primers se unirán sólo a la cadena molde cuando haya complementariedad total en todos sus nucleótidos (Pérez, 2011).

2.5 Sensibilidad

La sensibilidad se refiere a la capacidad de un sistema o modelo para responder a cambios en las condiciones o parámetros de entrada. En el caso de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la sensibilidad se refiere a la capacidad del método para detectar la presencia de secuencias de ADN específicas en muestras con bajas concentraciones de ADN (Vizcaíno, 2017). Varios factores pueden influir en la sensibilidad de la PCR, incluida la eficiencia de la

amplificación, la especificidad del cebador y las condiciones de reacción, para la estandarización de la PCR es importante garantizar una sensibilidad y confiabilidad del método en diferentes aplicaciones (Villacreses, 2021).

3 Materiales y métodos

El estudio: Estandarización del método PCR para la identificación genotípica de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* en muestras remitidas al (CRN RAM) INSPI QUITO se llevó a cabo en los laboratorios de Resistencia antimicrobiana del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.

Se utilizaron cepas bacterianas pertenecientes al cepario crioconservado del CNR-RAM procedentes de diversas casas de salud en un periodo de tiempo comprendidas entre 2020 a 2023.

3.1 Selección de cepas bacterianas

Las cepas fueron seleccionadas de la base de datos del cepario CRN-RAM de INSPI. Se analizaron previamente por parte de operarios del departamento de resistencia antimicrobiana mediante pruebas microbiológicas y de biología molecular para confirmar su especie.

3.2 Reactivación de cepas bacterianas

Luego de seleccionar las cepas bacterianas para su análisis, se descongelaron los viales a temperatura ambiente y se homogenizaron mediante vórtex por 1 minuto. Para recuperar y masificar la concentración de bacterias se sembraron 50µL del criovial conservado, en medio de cultivo caldo cerebro-corazón (BHI), y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

3.3 Siembra de bacterias

Se realizó una siembra por estriado en Agar MacConkey, se incubó 37 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se verificó el crecimiento de las cepas, analizando visualmente que coincida con las características morfológicas y organolépticas de la bacteria de interés, luego se tomó una cantidad significativa de colonias bacterianas y se inoculó en crioviales con 400µL de Buffer TE 1X, compuesto de 10 Mm Tris HCl y 1 Mm EDTA y se homogenizó mediante vórtex durante 20 segundos.

3.4 Identificación Bioquímica

Se tomó una colonia correctamente aislada de cada caja Petri en donde crecieron las cepas seleccionadas y se inocularon los tubos con las 6 pruebas bioquímicas requeridas: TSI (Triple Sugar Iron), LIA (Lysine Iron Agar), Simmons Citrato, Urea, SIM (Sulfide Indole Motility) y MRVP (Methyl Red Voges-Proskauer), para la identificación fenotípica de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca*.

Para el agar TSI y LIA la inoculación se llevó a cabo picando el medio hasta el fondo del tubo en línea recta y se estrió en zigzag en la superficie inclinada del agar. Para el agar Simmons Citrato y Urea, se estrió solo en zigzag por la superficie del medio. Para el agar SIM se inoculó el medio picando el agar hasta el fondo del tubo en línea recta sin estriado. Para el agar MRVP se inoculó el agar introduciendo y agitando el asa en el medio líquido vigorosamente.

3.5 Estandarización del protocolo PCR

3.5.1 Extracción de ácidos nucleicos

Se realizó la extracción del material genético de las bacterias seleccionadas mediante el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit de la marca Promega siguiendo el protocolo establecido por el fabricante con variaciones en el tiempo en que se aplica vórtex. Previa homogenización de la suspensión procedente de microbiología se tomó 1mL de la misma y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5mL. Se centrifugaron las muestras a máxima velocidad (14500rpm) por 4 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se añadió 600µL de solución de lisis nuclear, se homogenizó la solución mediante pipeteo ligero. Se incubaron los respectivos tubos a 80°C por 5 minutos en el Termobloque para que se produzca la lisis celular. Concluido el tiempo se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente. Se añadieron 3µL de solución de RNasa al lisado celular y se homogenizó la solución invirtiendo el tubo cerrado de 2 a 5 veces. Se añadió 200µL de solución de proteína de precipitación a cada tubo con la muestra

lisada, se homogenizó mediante pipeteo y vórtex a máxima velocidad por 20 segundos. Se aplicó choque térmico a las muestras incubándolas a -20°C en un congelador durante 5 minutos. Se centrifugaron las muestras a máxima velocidad por 4 minutos y se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un tubo Eppendorf diferente con $600\mu\text{L}$ de isopropanol refrigerado. Se homogenizó la solución invirtiendo el tubo hasta que sean visibles las hebras de ADN. Se centrifugaron nuevamente las muestras a 14500rpm durante 2 minutos y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Se añadió $600\mu\text{L}$ de etanol al 70% refrigerado y se homogeneizó la solución invirtiendo el tubo un par de veces. Se centrifugaron las muestras una última vez a máxima velocidad por 2 minutos y se drenó el etanol mediante pipeteo. Se dejaron secar los tubos Eppendorf dentro de la cabina de bioseguridad durante 15 minutos. Se añadieron $100\mu\text{L}$ de solución de rehidratación a cada tubo y se incubaron en Termobloque a 65°C durante 1 hora y se almacenaron los tubos con el ADN a -20°C a fin de preservar el material genético para su uso posterior.

3.5.2 Cuantificación de ADN

Para el proceso de cuantificación se empleó el espectrofotómetro NanoDrop 2000. Se realizó la medición del blanco dispensando $1\mu\text{L}$ de solución de rehidratación en el lector. Después se dispensó $1\mu\text{L}$ de cada muestra producto de la extracción de ADN en el lector y se registraron las lecturas de las diferentes concentraciones. Los valores obtenidos se analizaron conforme a la relación de absorbancia $260/280$ y $260/230$ para determinar calidad y pureza de los productos de la extracción. y los valores que indican que el ADN es puro oscilan entre 1,8 y 2. Se considera aceptable si los valores están por encima de 1,6, pues valores inferiores a estos son indicativos de contaminación por fenoles y proteínas, mientras que valores superiores a 2,1 pueden evidenciar la presencia de ARN en la muestra.

3.5.3 Determinación de gradientes

Se estableció un protocolo PCR con de temperaturas y ciclos térmicos basado en los propuestos por Yepes et al. (2022), Leza et al., 2022, Cole et al. (2009) y Mlynarcik et al. (2016) enfocados en la amplificación de genes en Enterobacterias.

Se inició la fase de experimentación con la prueba de un protocolo diseñado en base a las especificaciones propuestas por Espinosa (2007) que emplea los valores máximos delimitados en los gradientes térmicos para cada fase y los valores mínimos delimitados de tiempo para cada ciclo, mismos que se especifican en la tabla 2.

Tabla 2. Protocolo del termociclador para ensayos PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	-
Desnaturalización	95°C	30 segundos	30
Hibridación	55°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	-
Mantenimiento	4°C	∞	-

Nota: Elaborado por: (Los autores, 2023)

Para el ensayo PCR del protocolo térmico inicial se empleó un volumen de 25µL, una concentración de primers a 0,8µM y los volúmenes especificados en la tabla 3 para cada reacción.

Tabla 3. Volúmenes de componentes para prueba de protocolo térmico

Componente	Volumen (μL)
GoTaq Green	12,5
Primer Forward	2
Primer Reverse	2
Agua libre de nucleasas	7,5
ADN	1

Nota: Elaborado por: (Los autores, 2023)

3.5.4 Primers para la identificación de las bacterias

La estructura de los primers utilizados para la amplificación de los genes propuestos se estableció según lo descrito por Park et al. (2011) y se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Primers para la identificación de las bacterias

Gen	Enzima que codifica	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
<i>bla</i>	β -lactamasa	VO1, 5'-CATACCAGCCTGAATGAA-3' VO2, 5'-GTTTTGTCCGGGGATGTT-3'	1121
<i>hdc</i>	Histidina descarboxilasa	KPF2, 5'-AAAGCTGGGGGTATGTGACC-3' KPR4, 5'-GTGATGGAGTTTTTGTTC-3'	724
<i>pehX</i>	Poligalacturonasa	PEH-C, 5'-GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG-3' PEH-D, 5'-TAGCCCTTTATCAAGCGGATACTGG-3'	344

Nota: (Park et al., 2011) Elaborado por: (Los autores, 2023)

3.5.4.1 Gradiente de concentración de primers

Para determinar las concentraciones óptimas de primers se partió de una concentración inicial de 10μM. Se prepararon diferentes master mix en donde varía el volumen de los primers cuya

dilución permite alcanzar las concentraciones de: 0,4 μ M, 0,6 μ M y 0,8 μ M. Cada master mix contó con los cebadores Forward y reverse específicos para cada gen; *bla*, *hdc* y *pehX*. Los volúmenes para cada reacción se especifican en la tabla 5.

Una vez hecha la premezcla se homogenizó cada tubo mediante vórtex por 5 segundos y se dispensó 24 μ L de master mix y 1 μ L de la muestra de ADN en cada tubo de reacción, para llegar al volumen final de 25 μ L.

Tabla 5. Volúmenes para determinación de concentración óptima de primers

Componentes	Concentración de primers		
	0,4 μ M	0,6 μ M	0,8 μ M
Gotaq Green	12,5 μ L	12,5 μ L	12,5 μ L
Primer Forward	1 μ L	1,5 μ L	2 μ L
Primer Reverse	1 μ L	1,5 μ L	2 μ L
Agua libre de nucleasas	9,5 μ L	8,5 μ L	7,5 μ L
ADN	1 μ L	1 μ L	1 μ L

Nota: Elaborado por: (Los autores, 2023)

La amplificación se llevó a cabo programando el protocolo especificado en la tabla 3, que demostró ser eficiente en la amplificación de los genes propuestos. Se programó un termociclador ADN Bio-rad modelo C1000 con dicho protocolo. La placa en donde se cargaron las muestras contó con un control positivo con cada gen (*bla*, *hdc*, *pehX*) y un control negativo facilitados por el laboratorio de biología molecular CRN-RAM.

3.6 Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó el gel de agarosa pesando 4 g de agarosa y disolviéndolo en 200 mL de tris-acetato-EDTA (TAE) para alcanzar una concentración de 2%. Se disolvió la agarosa calentando el

matraz en un microondas por 2 minutos y medio. Posterior a un ligero enfriamiento de la disolución se añadió 2.5µL del intercalante Sybr Safe.

Para la corrida del gel se instaló la cámara de electroforesis de manera que el ADN migre del polo negativo al positivo. Se colocó el gel en la cámara y se vertió solución tampón TAE hasta cubrir el gel, posteriormente se cargó 6µL del marcador de peso molecular *Ikb DNA Ladder* en el primer pocillo y se dispensó 8µL de cada muestra procedente del termociclador en los demás pocillos del gel. Se inició la corrida electroforética a 80 voltios por 80 minutos.

3.6.1 Visualización de resultados

La visualización de las bandas después del proceso de electroforesis se realizó mediante un fotodocumentador *Bio-RAD Gel Doc XR*. Se introdujo el gel en el transiluminador y se inició el procedimiento. Por medio del programa computacional *Image Lab Software* conectado al equipo se indujo al gel a exposición de luz ultravioleta y se capturó la imagen obtenida.

La interpretación cualitativa de resultados se estableció en base a la expresión génica propuesta por Park et al. (2011), en donde se planteó el organismo y gen que amplificará al ejecutar un protocolo PCR eficaz, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Expresión génica en microorganismos de interés

	<i>bla</i>	<i>hdc</i>	<i>pehX</i>
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	X	X	
<i>Raoultella planticola</i>		X	
<i>Klebsiella oxytoca</i>			X

Nota: (Park et al., 2011) Elaborado por: (Los autores, 2023)

3.7 Evaluación de la capacidad diagnóstica PCR

3.7.1 Determinación de la especificidad de PCR

Se ejecutó el protocolo establecido para la amplificación de los genes propuestos en diferentes microorganismos ajenos a las bacterias de estudio. Se realizó el ensayo con 14 cepas bacterianas; 2 de cada género a excepción de *Klebsiella* de la que se utilizaron 4 cepas. Las especies utilizadas fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Shigella Flexneri*, *Shigella Sonnei*, *Serratia marcescens*, y *Escherichia coli*. Adicionalmente, se ensayó con 1 cepa perteneciente a cada bacteria de estudio planteado en los objetivos; *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* con el fin de evidenciar la presencia de amplicones frente a las bacterias con las que se comparará especificidad dentro del ensayo. Las cepas utilizadas se detallan en el anexo 5.

Para cada cepa se siguió la misma metodología propuesta, excluyendo los ensayos con pruebas bioquímicas. Se preparó una master mix para cada gen a una concentración de primers de 0,6μM y un volumen final de 25μL por reacción. Las muestras se amplificaron en el termociclador corriendo el protocolo previamente establecido (Tabla 2). Los productos de la amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% de concentración a 80 voltios por 80 minutos. El porcentaje de especificidad se calculó mediante la siguiente ecuación, planteada por Alejandro (2019)

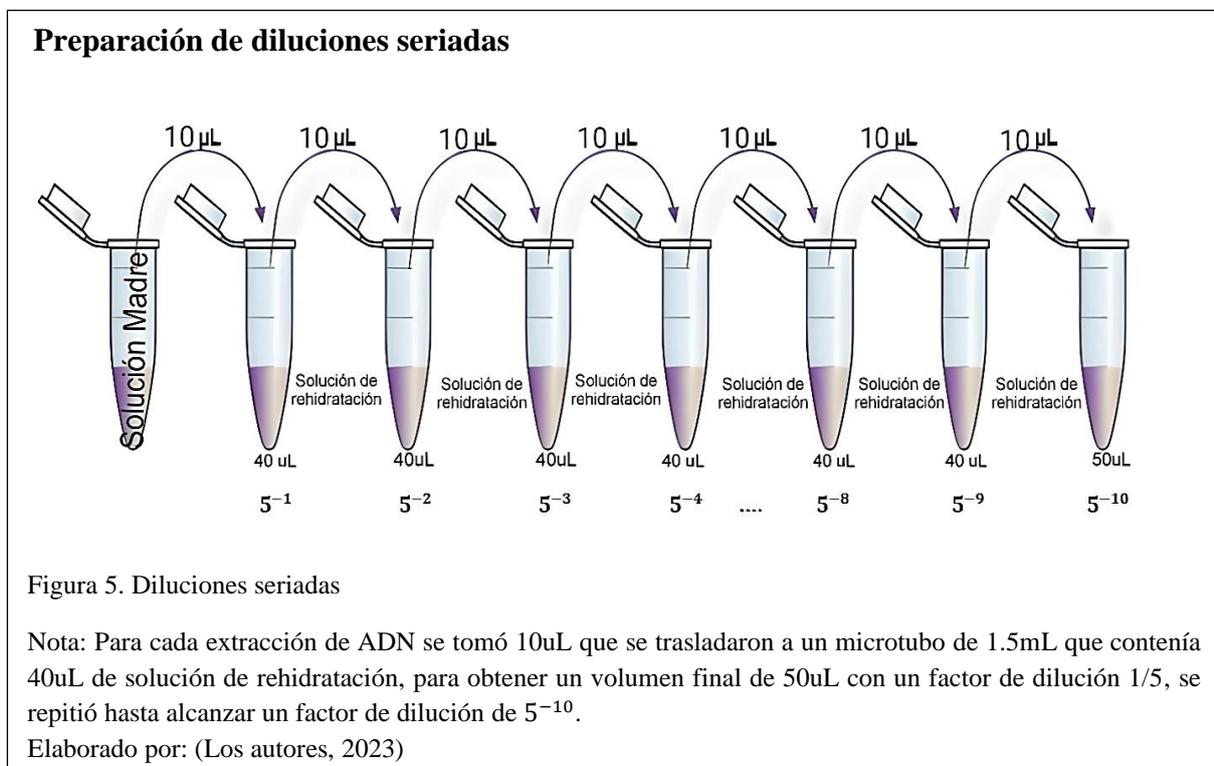
$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos(VN)}}{\text{Falsos (FP) + Verdaderos negativos (VN)}} * 100\%$$

3.7.2 Determinación de la sensibilidad de PCR

Se partió con la cuantificación de ácidos nucleicos extraídos para tener una concentración base. A las cepas de *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* se llevó a una misma concentración de ADN; 500ng/μL, mientras que para la muestra de *Raoultella planticola* se fijó

una concentración de 1200ng/ μ L fundamentado en los valores brindados por el espectrofotómetro. Los valores fijados en concentración se consiguieron mediante diluciones en solución de rehidratación.

Se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución 1/5 como se representa en la Figura 5. Para esto, factor de dilución 1/5, que contiene la muestra a una concentración preestablecida y se diluyó en un tubo eppendorf con 40 μ L de solución de rehidratación, que representa la dilución (5^{-1}). Se tomó 10 μ L de este tubo y se diluyó en el siguiente con 40 μ L de solución de rehidratación alcanzando la dilución (5^{-2}), y así repetidamente hasta alcanzar la dilución (5^{-10}).



Se amplificaron las diferentes diluciones de las 3 cepas de estudio; *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Klebsiella oxytoca* mediante PCR siguiendo el protocolo establecido y programado en el termociclador (Tabla 4) a una concentración de primers de 0,6 μ M, con los volúmenes especificados en (Tabla 5).

4 Resultados y discusión

4.1 Selección de cepas Bacterianas

La selección de cepas se estableció según la disponibilidad conforme se receiptó, provenientes de las diferentes casas de salud del sistema de salud nacional. Se contó con 4 cepas de *Raoultella ornithinolytica* pertenecientes al 2020 y una cepa perteneciente al 2023, 4 cepas de *Raoultella planticola* pertenecientes a 2020, 3 cepas pertenecientes a 2021 y 2 cepas pertenecientes a 2022. Finalmente se trabajaron con 2 cepas de *Klebsiella oxytoca*, una perteneciente a 2020 y otra al 2023.

Para los ensayos de especificidad se escogieron 14 cepas bacterianas pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae, mismas que comparten características taxonómicas descritas por Naum et al. (2008), en donde se analiza las relaciones filogenéticas de varias especies de esta familia mediante la secuencia del gen 16S rDNA para evaluar la solidez de este gen constitutivo en la ubicación taxonómica de patógenos entéricos.

El anexo 2 muestra una codificación individual alterna de las cepas usadas en los ensayos para mantener la confidencialidad de los datos de los pacientes y las unidades de salud involucradas.

4.2 Identificación Bioquímica

Tras el tiempo de incubación, se evidencia el crecimiento de los microorganismos inoculados en todos los agares en que se inocularon. Los resultados de los ensayos bioquímicos para identificación se reportan en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de los 6 ensayos bioquímicos para la identificación fenotípica

	TSI	LIA	Citrato	Urea	SIM Motilidad	Indol	MRVP
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (A-001)	A/A	+	+	+	-	+	+
<i>Raoultella planticola</i> (A-002)	A/A	+	+	+	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> (C-001)	A/A	+	+	+	-	-	-

Nota. A/A: Reacción ácida (Color amarillo). Elaborado por: (Los autores, 2023)

Las 3 cepas inoculadas en los respectivos agares presentaron fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa en el agar TSI además de producción de gas a excepción de *Raoultella planticola* (A-002). De igual manera los 3 microorganismos mostraron descarboxilación de lisina en el agar LIA, utilizaron el citrato como única fuente de carbono en el agar Simmons Citrato y producción de ureasa en el agar urea. Ninguna cepa mostró motilidad en el medio SIM, y en la producción de indol sólo *Raoultella ornithinolytica* (A-001) presentó resultado positivo. En el medio MRVP las cepas de *Raoultella ornithinolytica* (A-001) y *Raoultella planticola* (A-002), presentaron reacción positiva a la adición de rojo de metilo y Voges-Proskauer.

El comportamiento de las bacterias pertenecientes al género *Raoultella* frente a ensayos bioquímicos obedecen a lo reportado por Castillo et al. (2018), donde se detallan las características microbiológicas de las especies de este género, y algunos ensayos bioquímicos, como fermentación positiva de glucosa y resultado positivo en la prueba de Voges-Proskauer.

Además, se contrastan los resultados bioquímicos obtenidos de *Raoultella ornithinolytica* (A-001) y *Raoultella planticola* (A-002) con los presentados por García et al. (2013) en donde se detallan algunos ensayos bioquímicos ejecutados en cepas pertenecientes a esta especie, que

coinciden con los obtenidos en el presente estudio. El autor reporta resultados positivos para los ensayos: TSI, LIA, Citrato y urea en *Raoultella ornithinolytica* y *Raoultella planticola* simultáneamente, pero el ensayo de indol en el agar SIM y el ensayo de rojo de metilo en el agar MRVP tienden a variar para *Raoultella planticola*, pues el porcentaje de resultados positivos obtenidos fue del 15% y 32% respectivamente. Estos datos permiten contrastar la información obtenida en las cepas empleadas; pues coinciden con los resultados de los ensayos bioquímicos utilizados que se especifican en la tabla 8.

Aunque los agares bioquímicos identifiquen a la cepa (A-002) como *Raoultella planticola* ensayos moleculares posteriores demostrarán la inconsistencia en los resultados de estos métodos, pues se demostró finalmente que es un ejemplar de *Raoultella ornithinolytica*, pasando así a tomar esta codificación para el resto de los ensayos.

Basado en resultados de ensayos bioquímicos de bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* propuestos por Chaves (2002) se contrasta dicha información con los resultados obtenidos en *Klebsiella oxytoca* (C-001), en donde se observa una discrepancia en el comportamiento frente a un agar utilizado. La cepa presenta indol negativo en el agar SIM, que difiere con lo reportado por el autor, quien menciona que esta especie muestra formación de indol positivo. Esta discrepancia radica en el porcentaje de variabilidad en el resultado que pueden presentar estos organismos.

4.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

La tabla 9 muestra las diferentes concentraciones de ADN en las cepas destinadas a evaluar la capacidad diagnóstica del protocolo mediante ensayos de sensibilidad, en donde es crucial conocer la concentración base para alcanzar una concentración específica. La concentración de

ácidos nucleicos y relación de absorbancia del reto de cepas empleadas en los demás ensayos se describe en el anexo 3.

Tabla 8. Concentración y pureza de ADN en cepas para ensayos de sensibilidad

Código	Especie	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación A260/280	Relación A260/230
A-001	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	221,5	1,76	0,89
A-002	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	584,7	2,04	2,40
A-003	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	539,2	1,98	2,22
B-001	<i>Raoultella planticola</i>	1463,8	2,13	2,03
C-001	<i>Klebsiella oxytoca</i>	638,2	2,02	1,29
C-002	<i>Klebsiella oxytoca</i>	745,6	1,93	1,45

Nota: Elaborado por: (Los autores, 2023)

Las concentraciones de ADN en las cepas de *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Klebsiella oxytoca* empleadas en ensayos de sensibilidad cuentan con valores que varían entre 539,2ng/μL hasta 1463,8ng/μL en función del método de resuspensión utilizado. La calidad y pureza de las muestras se analizó mediante la relación de absorbancia 260/280 y 260/230 como se detalla en el informe propuesto por Banco Nacional de ADN (2020). El autor enfatiza los valores óptimos en estas relaciones de absorbancia que garantizan la ausencia de contaminantes en la muestra; para 260/280 los valores aceptables y óptimos oscilan entre 1.6 y 2,1 mientras que para la relación 260/230 pueden variar entre 1,8 y 2.2.

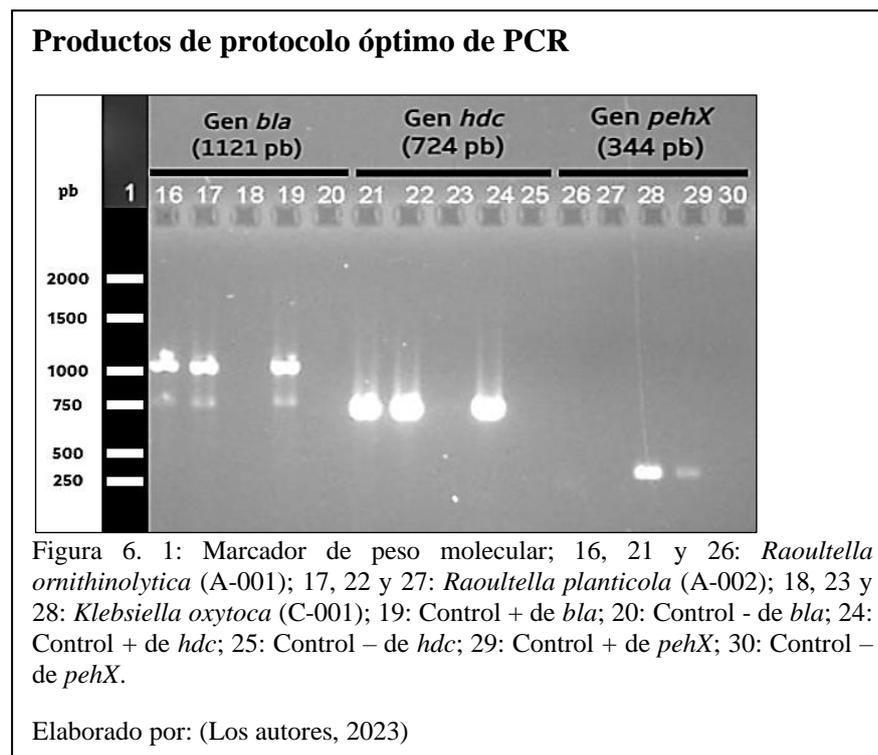
La cepa de *Raoultella ornithinolytica* (A-002), a una concentración 584,3ng/μL cuenta con valores de absorbancia 260/280 de 2,04 y absorbancia 260/230 de 2,4 lo que es indicativo de una muestra de alta calidad y pureza. La cepa de *Raoultella planticola* (B-001) a una

concentración de 1463,8ng/μL cuenta con valores de absorbancia 260/280 de 2,13 y absorbancia 260/230 de 2,08 que evidencian un alta calidad y pureza de la muestra. La cepa de *Klebsiella oxytoca* C-002 a una concentración de 745,6ng/μL cuenta con valores de absorbancia 260/280 de 1,93 y absorbancia 260/230 de 1,45 lo que es indicativo de una muestra con presencia considerable de sales, fenoles o hidratos de carbono.

4.4 Método molecular de identificación bacteriana

4.4.1 Protocolo óptimo para PCR

Los ensayos iniciales basados en recomendaciones descritas por Yepes et al. (2022), Leza et al. (2022), Cole et al. (2009), Mlynarcik et al. (2016) y Espinosa (2007), especificados en la tabla 3 resultaron ser eficaces para la amplificación de los genes de interés. En la figura en la figura 6 se evidencia los resultados del ensayo de prueba con este protocolo. Los carriles del 2 al 15 correspondieron a ensayos de vigilancia epidemiológica que no forman parte de la investigación en curso, realizador por operarios alternos, por lo que se excluyen de la imagen.



La presencia de bandas para la amplificación de los genes propuestos demuestra la efectividad del protocolo especificado en la tabla 2, mismo que se utilizó en los demás ensayos de la investigación propuesta. En la figura 6 se observa presencia de amplificación para el gen *bla* en los carriles: 16, 17 y 19, que corresponden a *Raoultella ornithinolytica* (A-001), *Raoultella planticola* (A-002) y el control positivo del gen *bla* respectivamente. Según lo descrito por Park et al. (2011) *Raoultella ornithinolytica* es el único microorganismo del estudio que es portador de los genes *bla* y *hdc* simultáneamente; por lo que, la presencia de amplicón *bla* por parte de *Raoultella planticola* (A-002) evidencia que se trata de una cepa de *Raoultella ornithinolytica* erróneamente identificada por parte de los métodos fenotípicos. Se aprecia también amplificación para el gen *hdc* en los carriles: 17, 22 y 24, que corresponden a *Raoultella ornithinolytica* (A-001), *Raoultella planticola* (A-002) (Cepa erróneamente identificada) y el control positivo para el gen *hdc* respectivamente. La presencia de estos amplicones identifican a los microorganismos cargados de los carriles: 17 y 22 como *Raoultella ornithinolytica* y se constata la identificación errónea obtenida en la amplificación del gen *bla* en estas cepas.

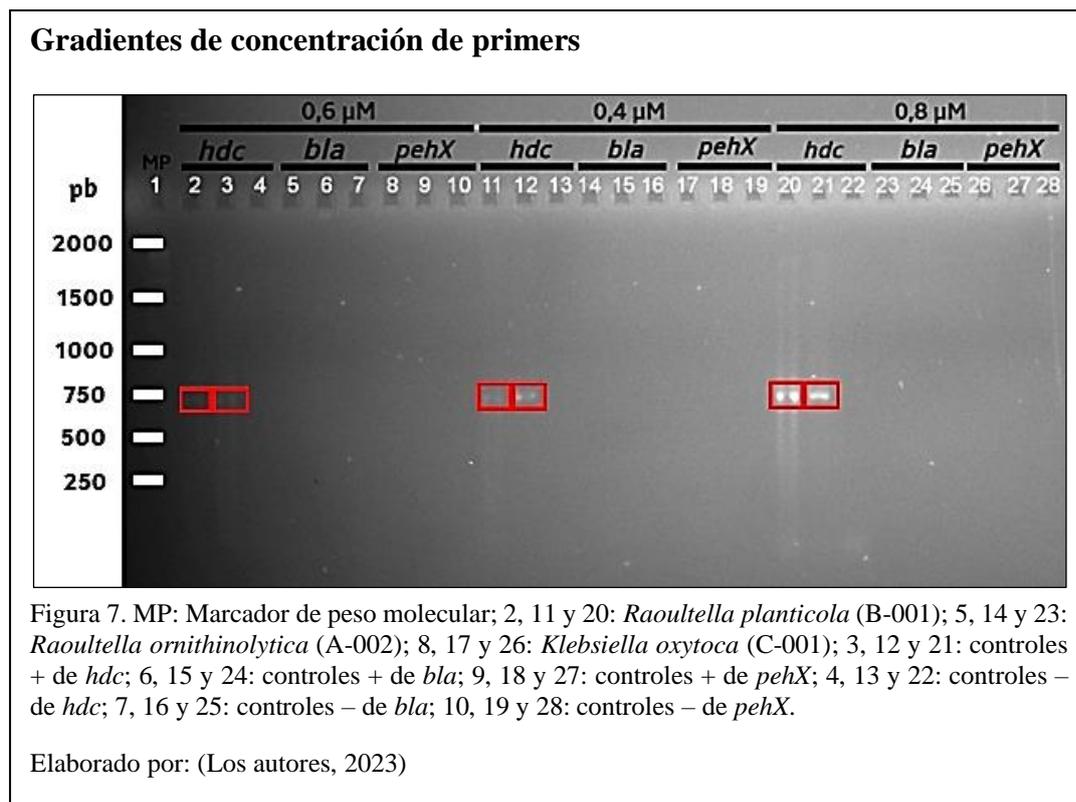
La presencia de bandas en los carriles: 28 y 29, correspondientes a *Klebsiella oxytoca* y al control positivo del gen *pehX* confirman la identificación de esta cepa como *Klebsiella oxytoca*.

Se le otorgó a la cepa erróneamente identificada; *Raoultella planticola* (A-002) una nueva codificación y se utilizó la misma como *Raoultella ornithinolytica* en los ensayos posteriores debido a su alta concentración de ADN. Se trabajó con una cepa nueva, previamente confirmada como *Raoultella planticola* (B-001) en los demás ensayos.

4.5 Optimización de las condiciones de amplificación PCR

4.5.1 Gradiente de concentración de primers

Los gradientes planteados se fundamentan en las observaciones propuestas por Van Pelt-Verkuil et al. (2008), en donde se detalla que, para una correcta amplificación mediante PCR, la concentración de primers debe oscilar entre 0,1 y 1 μM . Es así como se ejecutaron protocolos con concentraciones pertenecientes a este rango; 0,4; 0,6 y 0,8 μM .



Como se muestra en la figura 7, hay presencia de bandas producto de la amplificación en las 3 concentraciones propuestas; 0,4; 0,6 y 0,8 μM para los genes de interés, no obstante, se visualizan amplicones en los carriles: 2, 11 y 20 pertenecientes a *Raoultella planticola* (B-001) a 0,6; 0,4 y 0,8 μM respectivamente, además de amplicones en los carriles 3, 12 y 21 pertenecientes a los controles positivos, todos ellos ejecutados para la amplificación del gen *hdc*. La ausencia de bandas en los carriles: 5, 6, 8, 9, 14, 15, 17, 18, 23, 24, 26 y 27 es indicativo

de inconvenientes en la reacción; factores ambientales que produjeron la degradación de los ácidos nucleicos.

La amplificación de la cepa *Raoultella planticola* (B-001) y los controles positivos del gen *hdc* fueron suficientes para obtener contraste entre las bandas obtenidas y discernir la concentración óptima. Las bandas a concentraciones de 0,4 y 0,6 μ M, si bien son algo tenues, están presentes y con un nivel de fluorescencia suficiente para su distinción. Los amplicones obtenidos con una concentración de 0,8 μ M son más brillantes, pero utilizan un volumen de primers mayor, mismo que puede ser empleado en la ejecución de más reacciones, por tanto, el gradiente de concentración de primers se establece en 6 μ M y podrá emplear una concentración en función del nivel de fluorescencia que se desea tener en la visualización de bandas.

4.6 Evaluación de la capacidad diagnóstica del protocolo PCR

4.6.1 Determinación de especificidad

La especificidad del protocolo establecido se ve influenciado por varios factores en el proceso de PCR. Según Pérez (2011), la especificidad del ensayo depende de la temperatura de hibridación y las secuencias que conforman los primers al inicio de la reacción. Por eso los cebadores utilizados los forman las mismas secuencias que los descritos por Park et al.(2011) para la amplificación de *Raoultella* y *Klebsiella*; especificados en la tabla 5.

Ensayo de especificidad para la amplificación del gen *bla*

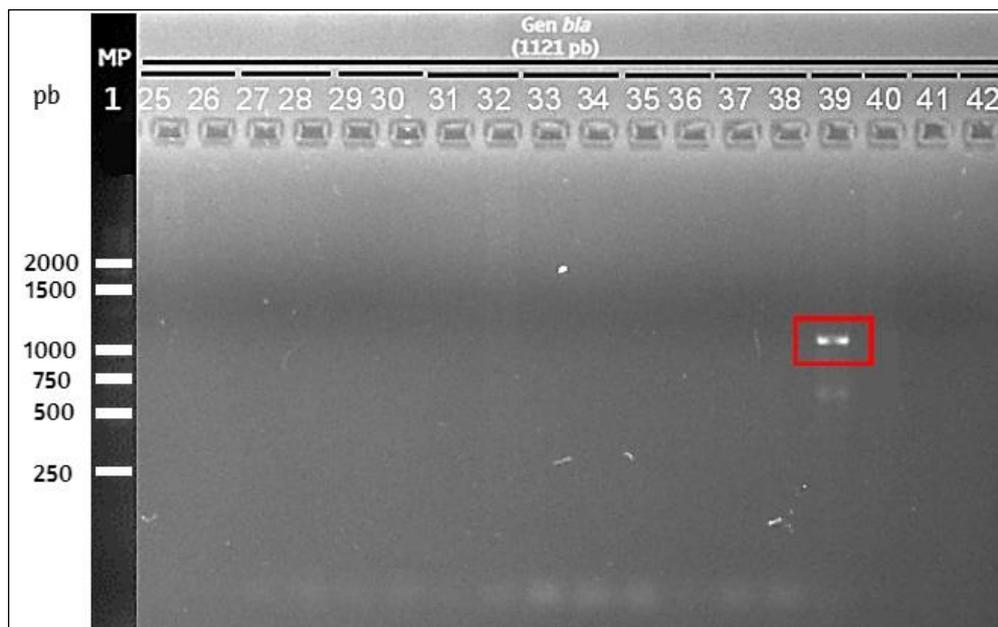


Figura 8. MP: Marcador de Peso Molecular; 25 y 26: *Klebsiella pneumoniae* (D-001) y (D-002); 27 y 28: *Pseudomona aeruginosa* (E-001) y (E-002); 29 y 30: *Salmonella typhi* (F-001) y (F-002); 31 y 32: *Klebsiella aerogenes* (G-001) y (G-002); 33: *Shigella flexneri* (H-001); 34: *Shigella sonnei* (I-001); 35 y 36: *Serratia marcescens* (J-001) y (J-002); 37 y 38: *Escherichia coli* (K-001) y (K-001); 39: *Raoultella ornithinolytica* (A-002); 40: *Raoultella planticola* (B-001); 41: *Klebsiella oxytoca* (C-002); 42: control – de *bla*.

Elaborado por: (Los autores, 2023)

El ensayo descrito en la figura 8 determinó la especificidad del protocolo establecido y primers utilizados para la amplificación del gen *bla* en *Raoultella ornithinolytica*. En el gel se aprecia una banda con un peso molecular de 1121 pb en el carril 39, perteneciente a la cepa *Raoultella ornithinolytica* (A-002); única especie de estudio en ser portador del gen *bla*, según lo descrito por Castillo, et al. (2018).

Ensayo de especificidad para la amplificación del gen *hdc*

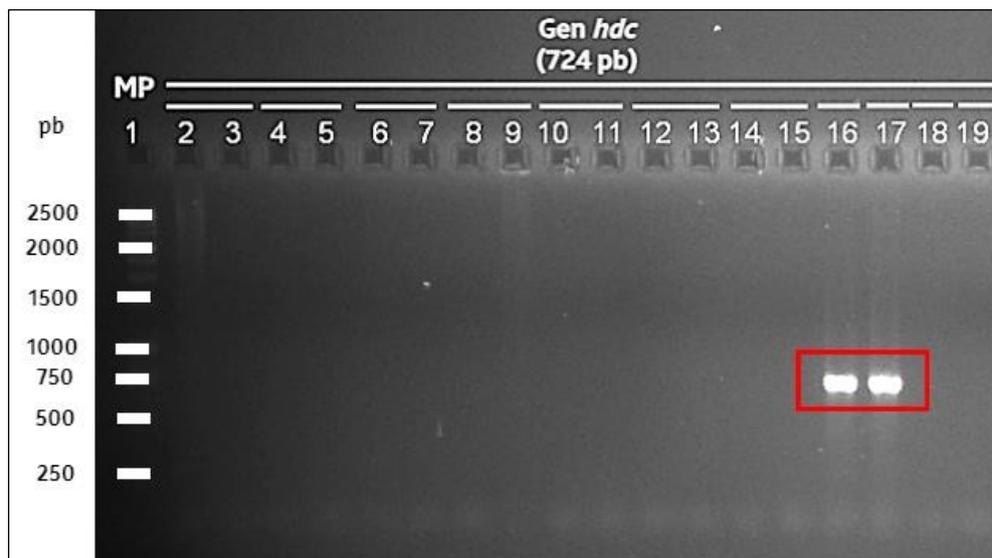


Figura 9. MP: Marcador de Peso Molecular; 2 y 3: *Klebsiella pneumoniae* (D-001) y (D-002); 4 y 5: *Pseudomona aeruginosa* (E-001) y (E-002); 6 y 7: *Salmonella typhi* (F-001) y (F-002); 8 y 9: *Klebsiella aerogenes* (G-001) y (G-002); 10: *Shigella flexneri* (H-001); 11: *Shigella sonnei* (I-001); 12 y 13: *Serratia marcescens* (J-001) y (J-002); 14 y 15: *Escherichia coli* (K-001) y (K-001); 16: *Raoultella ornithinolytica* (A-002); 17: *Raoultella planticola* (B-001); 18: *Klebsiella oxytoca* (C-001); 19: control – de *hdc*.

Elaborado por: (Los autores, 2023)

El ensayo caracterizado en la figura 9 determinó la especificidad del protocolo establecido en base a los primers utilizados para la amplificación del gen *hdc* en *Raoultella ornithinolytica* y *Raoultella planticola*. En el gel se aprecian 2 bandas en los carriles: 16 y 17 con un peso molecular de 724 pb, pertenecientes a las cepas *Raoultella ornithinolytica* (A-002) y *Raoultella planticola* (B-001) respectivamente. Según lo planteado por Park et al. (2011), estos 2 microorganismos son portadores del gen *hdc*.

Ensayo de especificidad para la amplificación del gen *pehX*

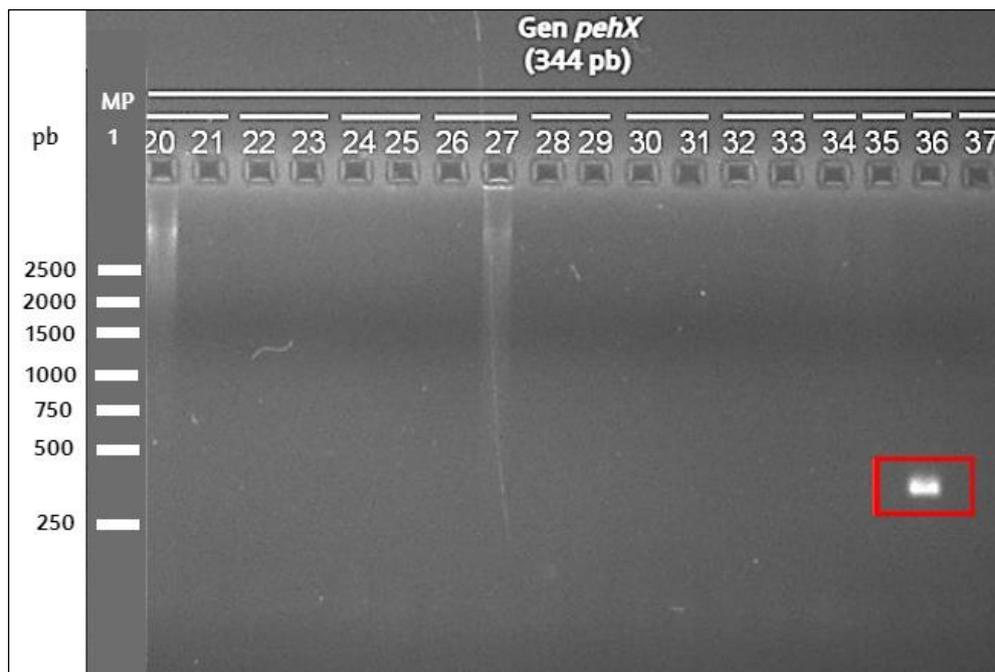


Figura 10. MP: Marcador de Peso Molecular; 20 y 21: *Klebsiella pneumoniae* (D-001) y (D-002); 22 y 23: *Pseudomona aeruginosa* (E-001) y (E-002); 24 y 25: *Salmonella typhi* (F-001) y (F-002); 26 y 27: *Klebsiella aerogenes* (G-001) y (G-002); 28: *Shigella flexneri* (H-001); 29: *Shigella sonnei* (I-001); 30 y 31: *Serratia marcescens* (J-001) y (J-002); 32 y 33 *Escherichia coli* (K-001) y (K-001); 34: *Raoultella ornithinolytica* (A-002); 35: *Raoultella planticola* (B-001); 36: *Klebsiella oxytoca* (C-001); 37: control – de *pehX*.

Elaborado por: (Los autores, 2023)

El ensayo presentado en la figura 10 se empleó para determinar la especificidad del protocolo en la amplificación del gen *pehX* exclusivamente en cepas de *Klebsiella oxytoca*. En el gel se observa la presencia de una banda en el carril 36, con un peso molecular de 344 pb perteneciente a la cepa *Klebsiella oxytoca* (C-001). Según lo reportado por Park et al. (2011), este microorganismo es el único, de entre las cepas de estudio, que es portador del gen *pehX*.

La ausencia de amplicones en los pocillos cargados con muestras de otros géneros o especies de enterobacterias ajenas a las establecidas en la investigación propuesta; *Klebsiella* spp, *Pseudomona* sp., *Shigella* spp., *Serratia* sp. Y *Escherichia* sp. obedece a la premisa de

especificidad del protocolo, siendo capaz de amplificar únicamente los genes *bla*, *hdc*, y *pehX* en *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Klebsiella oxytoca*.

De acuerdo con la ecuación de especificidad propuesta por Bravo & Cruz (2015) el ensayo PCR consiguió un 100% de especificidad para la amplificación de los genes *bla*, *hdc* y *pehX* con un tamaño de muestra de 14 cepas de enterobacterias ajenas a las cepas de estudio.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos (VN)}}{\text{Falsos (FP) + Verdaderos negativos (VN)}} * 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{14(\text{VN})}{0(\text{FP}) + 14(\text{VN})} * 100\%$$

$$\text{Especificidad} = 100\%$$

La ausencia de falsos positivos en los ensayos es lo que permite obtener un porcentaje del 100% en especificidad del protocolo para discriminar entre las especies de interés y aquellas con quienes comparten similitudes taxonómicas.

4.6.2 Determinación de sensibilidad

Para determinar las concentraciones mínimas a las cuales el protocolo resulta eficiente se siguieron las recomendaciones de Alejandro (2019). A diferencia del autor, se realizaron 10 diluciones seriadas para determinar valores específicos de concentraciones a las que hay presencia de amplificación.

Ensayo de sensibilidad para la amplificación del gen *bla*

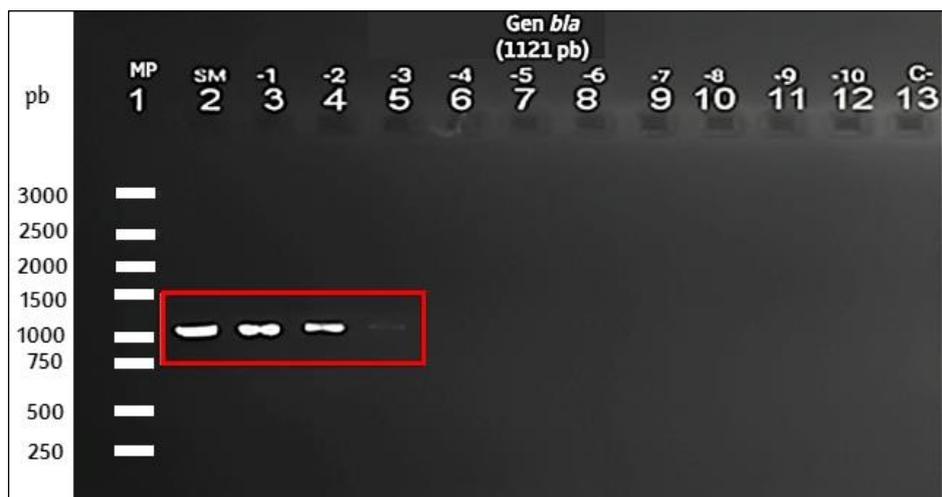


Figura 11. MP: Marcador de Peso Molecular; SM: solución madre; -1: primera dilución N/5; -2: Segunda dilución N/5; -3: Tercera dilución N/5; -4: Cuarta dilución N/5; -5: Quinta dilución N/5; -6: Sexta dilución N/5; -7: Séptima dilución N/5; -8: Octava dilución N/5; -9: Novena dilución N/5; -10: Décima dilución N/5; C-: Control negativo de *bla*; N: Concentración de ADN.

Elaborado por: (Los autores, 2023)

El gel representado en la figura 11 se utilizó para establecer la concentración mínima de ADN que el protocolo es capaz de detectar y amplificar el gen *bla*. Para la cepa de *Raoultella ornithinolytica* (A-002), que previamente se cuantificó arrojó resultados de 584,3ng/μL. Se realizó una dilución en solución de rehidratación para conseguir un valor entero; 500ng/μL, que corresponde a la solución madre de la cuál partieron las diluciones seriadas hasta alcanzar la dilución -10.

Se visualiza presencia de bandas en los carriles: 2, 3, 4 y 5 con un peso molecular de 1121 pb que corresponden a la solución madre (500ng/μL), dilución -1 (100ng/μL), dilución -2 (20ng/μL), dilución -3 (4ng/μL) respectivamente. Por ende, se determina que el protocolo establecido es capaz de detectar y amplificar muestras de ADN con una concentración mayor o igual a 4ng/μL.

Ensayo de sensibilidad para la amplificación de gen *hdc*

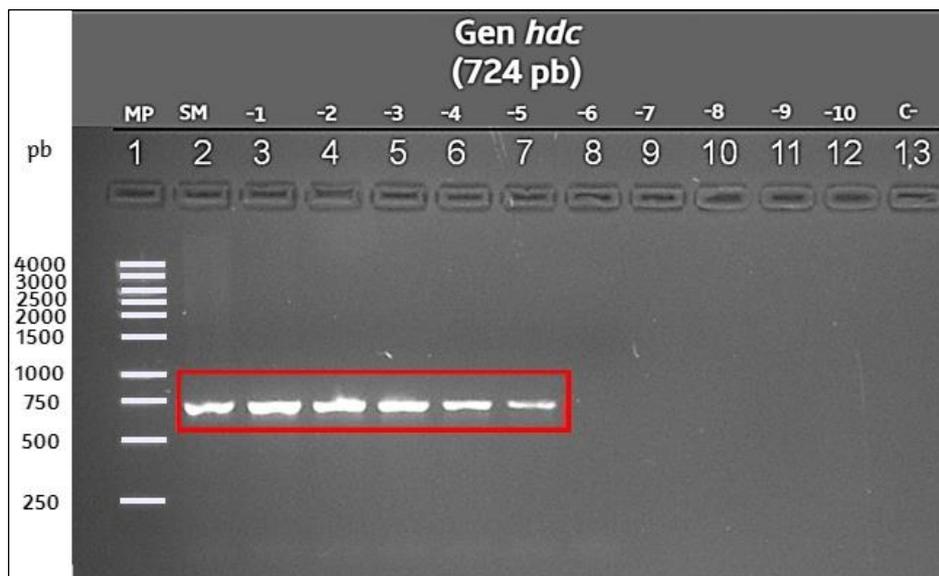


Figura 12. MP: Marcador de Peso Molecular; SM: solución madre; -1: primera dilución N/5; -2: Segunda dilución N/5; -3: Tercera dilución N/5; -4: Cuarta dilución N/5; -5: Quinta dilución N/5; -6: Sexta dilución N/5; -7: Séptima dilución N/5; -8: Octava dilución N/5; -9: Novena dilución N/5; -10: Décima dilución N/5; C-: Control negativo de *hdc*; N: Concentración de ADN.

Elaborado por: (Los autores, 2023)

El gel que se evidencia en la figura 12 se empleó para establecer la concentración mínima de ADN que el protocolo es capaz de detectar y amplificar el gen *hdc*. Para la cepa de *Raoultella planticola*, que previamente se cuantificó arrojó resultados de 1463,8ng/μL. Se diluyó en solución de rehidratación hasta conseguir un valor entero de 1200ng/μL, que corresponde a la solución madre de la cual partieron las diluciones seriadas hasta alcanzar la dilución -10.

Se visualiza presencia de bandas en los carriles: 2, 3, 4, 5, 6 y 7 con un peso molecular de 724pb que corresponden a la solución madre (1200ng/μL), dilución -1 (240ng/μL), dilución -2 (48ng/μL), dilución -3 (9,6ng/μL), dilución -4 (1,92ng/μL) y dilución -5 (0,38ng/μL) respectivamente. Por ende, se determina que el protocolo establecido es capaz de detectar y amplificar muestras de ADN con una concentración mayor o igual a 0,38ng/μL.

Ensayo de sensibilidad para la amplificación del gen *pehX*

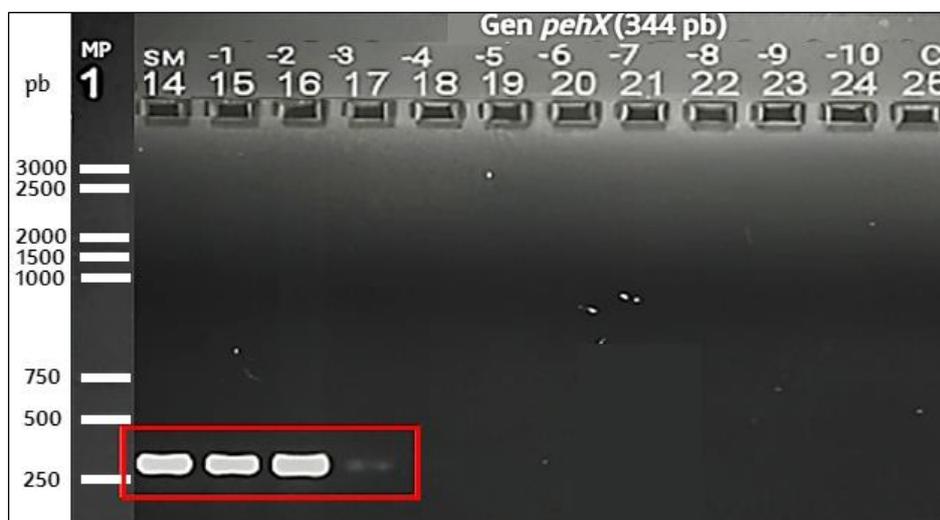


Figura 13. MP: Marcador de Peso Molecular; SM: solución madre; -1: primera dilución N/5; -2: Segunda dilución N/5; -3: Tercera dilución N/5; -4: Cuarta dilución N/5; -5: Quinta dilución N/5; -6: Sexta dilución N/5; -7: Séptima dilución N/5; -8: Octava dilución N/5; -9: Novena dilución N/5; -10: Décima dilución N/5; C-: Control negativo de *pehX*; N: Concentración de ADN.

Elaborado por: (Los autores, 2023)

El ensayo mostrado en la figura 13 se empleó para establecer la concentración mínima de ADN que el protocolo es capaz de detectar y amplificar el gen *pehX*. Para la cepa de *Klebsiella oxytoca* (C-002), que previamente se cuantificó arrojó resultados de 745,6ng/μL. Se diluyó en solución de rehidratación hasta alcanzar un valor entero de 500ng/μL, que corresponde a la solución madre de la cuál partieron las diluciones seriadas hasta alcanzar la dilución -10.

Se visualiza presencia de bandas en los carriles: 14, 15, 16 y 17 con un peso molecular de 344pb que corresponden a la solución madre (500ng/μL), dilución -1 (100ng/μL), dilución -2 (20ng/μL), dilución -3 (4ng/μL) respectivamente. Por ende, se determina que el protocolo establecido es capaz de detectar y amplificar muestras de ADN con una concentración mayor o igual a 4ng/μL

En base a los valores obtenidos en los diferentes ensayos de sensibilidad se corrobora la eficiencia y la alta sensibilidad del protocolo estandarizado, pues, de entre todos los ensayos, los valores que presentan menor sensibilidad (*bla* y *pehX*) son capaces de detectar y amplificar ADN hasta una concentración de 4ng/μL; concentraciones menores a las que se exige para experimentar. El BNA (2020) especifica que la concentración mínima de ADN para la amplificación de material genético por PCR debe ser mayor o igual a 10ng/μL, por lo que el protocolo es capaz de detectar concentraciones incluso menores a los parámetros mínimos mencionados.

Conclusiones

La estandarización de la técnica molecular PCR permitió establecer un protocolo para la amplificación los genes *bla*, *hdc* y *pehX*, demostrando efectividad en la identificación genotípica de *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Raoultella oxytoca*.

Las condiciones térmicas óptimas del protocolo para la amplificación de los genes de interés fueron: Desnaturalización inicial por 5 minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto cada uno, extensión final a 72°C por 7 minutos.

El protocolo evidenció amplificación de genes en base a un gradiente de concentración de primers de 6µM y una concentración mínima de ADN de 0,38ng/µL, en donde los resultados revelaron un excelente bandeo y baja presencia de estructuras secundarias

El protocolo estandarizado cuenta con una alta especificidad y sensibilidad, capaz de amplificar genes de interés exclusivamente en los microorganismos planteados, y a una concentración de ácidos nucleicos menor a los parámetros mínimos requeridos para este tipo de ensayos.

La inconsistencia en los resultados arrojados por métodos fenotípicos tradicionales puede llevar a la obtención de datos no concluyentes o erróneos en la identificación bacteriana, por lo que, la implementación de técnicas genotípicas resulta en una alternativa de utilidad para este fin.

Recomendaciones

Se recomienda ampliar la estandarización de protocolos para la identificación de enteropatógenos con el diseño de primers para la amplificación de regiones específicas en bacterias pertenecientes a los géneros estudiados, como *Raoultella terrigena* o *Raoultella eléctrica*.

Se recomienda ampliar la información obtenida en el proyecto mediante la secuenciación de los genes estudiados a fin de ampliar las bases de datos genéticas enfocadas a enteropatógenos de importancia clínica.

Se recomienda emplear métodos estándares para la extracción de ácidos nucleicos, y evitar así la obtención de concentraciones bajas; inferiores a los que el método propuesto es capaz de detectar.

Bibliografía

- Abiuso, Varela, Haro, & Besio. (2017). Inhibidores de histidina decarboxilasa atenúan la actividad proangiogénica de células de Leydig tumorales: ¿Potencial terapia neoadyuvante para el tratamiento de leydigomas? *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 54(4), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.raem.2017.08.001>
- Aguirre, H. I. (2012). *Colorante safranina*. <http://www.medigraphic.com/rid>
- Alejandro, R. R. (2019). *Estandarización de un protocolo para la rápida detección del gen bla-KPC en bacterias gramnegativas resistentes a carbapenémicos mediante el uso de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)*.
- Banco Nacional de ADN. (2020). *Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*. https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-
- Beltrán, Otálora, K., Angélica Daza, L., & Hernández-Fernández, J. (2013). *Estandarización de la técnica de PCR para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas cabezona (Caretta caretta) y Carey (Eretmochelys imbricata) anidantes del Caribe colombiano*.
- Beye, M., Hasni, I., Seng, P., Michelle, C., La Scola, B., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2018). Genomic analysis of a *Raoultella ornithinolytica* strain causing prosthetic joint infection in an immunocompetent patient. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27833-z>
- Biolife. (2023). *Simmons Citrate Agar*. www.biolifeitaliana.it.
- Bolívar, A. M., Rojas, A., & García, P. (2014). *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. 3(1), 25–33.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8, pp. 601–608). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bravo, S., & Cruz, J. P. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica Herramientas para su interpretación. *Revista Chilena de Radiología*, 21, 158–164. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchradiol/v21n4/art07.pdf>
- Brisse, S., Issenhuth-Jeanjean, S., & Grimont, P. A. D. (2004). Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3388–3398. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3388-3398.2004>

- Cárdenas. (2016). *Identificación por PCR del agente etiológico de bronconeumonía bacteriana en los pacientes del hospital general macas, 2016.*
- Carrasco. (2022). *Utilidad de PCR multiplex para el diagnóstico complementario de patógenos gastrointestinales.*
- Castillo. (2014). *Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de Helicobacter pylori en aguas de consumo.*
- Castillo, A., Flores, A., Llaca, J., Pérez, F., & Casillas, N. (2018). Microbiología del género *Raoultella*, características clínicas y dificultades para su diagnóstico. In *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* (Vol. 56, Issue 4).
- Castillo, Flores Aréchiga, A., Llaca Díaz, J., Pérez Chávez, F., & Casillas Vega, N. (2018). Microbiología del género *Raoultella*, características clínicas y dificultades para su diagnóstico. In *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* (Vol. 56, Issue 4).
- Chaves, J. (2002). *Caracterización Molecular del gen de la β -Lactamasa SHV-1 Klebsiella pneumoniae.*
https://www.academia.edu/55696938/Caracterizaci%C3%B3n_molecular_del_gen_de_la_%C3%9F_lactamasa_SHV_1_en_Klebsiella_pneumoniae
- Cole, J., Schuetz, A., Hill, C., & Nolte, F. (2009). Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 322–326. <https://doi.org/10.1128/JCM.01550-08>
- De Los Ángeles, M., Contreras, S., Flores, T. G., Del Rosario, T., Talavera, A., Martínez, Z., Aracely, N., & López, P. (2017). *¿Qué son los microbios?*
- Dorado, G. (2014). *Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).*
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 925–932. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-925>
- Espinosa, L. (2007). *Guía práctica sobre la técnica de PCR.*
<https://criminalistica.mx/descargas/documentos/pdf/PCR%20guia.pdf>
- Farmer, J. J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., & Fanning, G. R. (2021). Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated

- from clinical specimens. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 46–76). <https://doi.org/10.1128/jcm.21.1.46-76.1985>
- García, T., Pascual, F. J., & Aznar, E. (2013). *Raoultella ornithinolytica* en infecciones de las vías urinarias. Estudio clínico y microbiológico de una serie de 4 pacientes con neoplasias. In *Medicina Clinica* (Vol. 141, Issue 3, pp. 138–139). <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2012.11.021>
- Giraldo, A., Aguilera, A. M., Urbano, E. X., Pedraza, A. M., & Jaimes, C. P. (2021). Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(2), 7–19. <https://doi.org/10.18359/rfcb.5012>
- Gonzales, Corzo Pedroza, M., Romero Alvarez, M., & Martinez, O. (2018). Carbapenemase-Producing *Raoultella Planticola*: A Rare Cause of Pneumonia and Bacteremia. *Diseases*, 6(4), 94. <https://doi.org/10.3390/diseases6040094>
- Hajjar, R., Ambaraghassi, G., Sebahang, H., Schwenter, F., & Su, S. H. (2020). *Raoultella ornithinolytica*: Emergence and resistance. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 13, pp. 1091–1104). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S191387>
- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. (2023). *Centro de Resistencia a los Antimicrobianos*. <http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ram/>
- InsumoLab. (2018). *Agar LIA (agar de hierro y lisina)*. https://www.insumolab.cl/descargas/educacion/tubos/12x100/ficha_tecnica/02.pdf
- Janda, M., & Abbott, S. (2002). Bacterial identification for publication: When is enough enough? In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 40, Issue 6, pp. 1887–1891). <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1887-1891.2002>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). *Polymerase Chain Reaction: Methods, principles, and applications*. www.ss-journals.com
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Shibata, T. (2002). *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3462–3466. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3462-3466.2002>
- Kovtunovych, G., Lytvynenko, T., Negrutka, V., Lar, O., Brisse, S., & Kozyrovska, N. (2003). Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the *polygalacturonase pehX* gene. *Research in Microbiology*, 154(8), 587–592. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00148-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00148-7)

- Lam, P. W., & Salit, I. E. (2014). *Raoultella planticola* bacteremia following consumption of seafood. In *Can J Infect Dis Med Microbiol* (Vol. 25).
- Leza, T., Víquez, E., Barquero, E., Sancho, C., & Umaña, R. (2022). Optimización de la PCR en punto final y en tiempo real para la detección de *Salmonella* entérica serotipo *Gallinarum* en aves de corral de Costa Rica. *UNED Research Journal*, *14*(1), e3831. <https://doi.org/10.22458/urj.v14i1.3831>
- Lorenz. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, *63*. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Manzaba. (2019). *Estandarización de una técnica molecular de PCR para identificación de especies de Leishmania*. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21719/1/TESIS%20CRISTINA%20MANZABA.pdf>
- Martínez, C. M., Rojas Kozhakin, D. V., Villamil Forero, M. A., Rodríguez Giraldo, M., Montenegro Vargas, J. G., & Cabal, N. (2022). *Raoultella planticola* pneumonia in a patient with critical COVID-19. *Acta medica peruana*, *39*(1). <https://doi.org/10.35663/amp.2022.391.2200>
- MCD Lab. (2013). *Agar Urea Christensen - Ficha Técnica*.
- MDM Científica. (2020). *Serie de identificación SIM MDM Tubo X 3mL*.
- Mlynarcik, P., Roderova, M., & Kolar, M. (2016). Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *9*(1). <https://doi.org/10.5812/jjm.29314>
- Mollinedo, M. A., & Gonzáles, V. C. (2014). *Bacterias Gramnegativas*.
- Murray, C., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2005). *Medical microbiology*. Elsevier Mosby.
- Nakasone, E. S., Kaneshiro, R., Kathleen, ;, Ba, M., & Tokeshi, J. (2015). *Emergence of Raoultella ornithinolytica on O'ahu: A Case of Community-acquired R. ornithinolytica Urinary Tract Infection* (Vol. 74).

- Naum, M., Brown, E., & Mason, R. (2008). Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the enterobacteriaceae? *Journal of Molecular Evolution*, 66(6), 630–642. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9115-3>
- Neog, N., Phukan, U., Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2021). *Klebsiella oxytoca* and Emerging Nosocomial Infections. In *Current Microbiology* (Vol. 78, Issue 4, pp. 1115–1123). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02402-2>
- Olmos, A., De la Fuente, C., Nieto, J. A., & Ramos, S. (2010). *Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología* (E. Cercenado & C. Rafael, Eds.; 37th ed.).
- Olson, D. S., Asare, K., Lyons, M., & Hofinger, D. M. (2013). A novel case of *Raoultella planticola* urinary tract infection. *Infection*, 41(1), 259–261. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0294-x>
- Palma, J. (2010). *Rediseño de un termociclador para la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN)*.
- Park, J. S., Hong, K. H., Lee, H. J., Choi, S. H., Song, S. H., Song, K. H., Kim, H. Bin, Park, K. U., Song, J., & Kim, E. C. (2011). Evaluation of three phenotypic identification systems for clinical isolates of *Raoultella ornithinolytica*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(4), 492–499. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.020768-0>
- Pérez, A. M. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
- Pérez, A., & Miryam, L. (2018). Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa. *Tecnológico de Antioquia*, 163–168. <https://dspace.tdea.edu.co/handle/tdea/1468>
- Pintos, I., Cantero Caballero, M., Rubio, E. M., Sánchez Romero, I., Asensio Vegas, Á., & Ramos Martínez, A. (2020). Epidemiology and clinical of infections and colonizations caused by enterobacteriales producing carbapenemases in a tertiary hospital. *Revista Española de Quimioterapia*, 33(2), 122–129. <https://doi.org/10.37201/req/086.2019>
- Pérez, M., & Mota, M. (2008). *Morfología y estructura bacteriana*.
- Prada, M. C., Luengas Monroy, M. A., Suárez, A., Mora Ramírez, L. M., & Faccini Martínez, Á. A. (2021). *Raoultella ornithinolytica* urinary tract infection in a pediatric patient with t-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 78(4), 346–349. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000280>
- Proaño. (2019). *Desarrollo, estandarización y aplicación de la técnica molecular PCR para la detección y cuantificación de ADN del trematodo*.

- Quintela Baluja, M. (2022). *Desarrollo y optimización de tecnologías ómicas para la identificación y caracterización de bacteria alterantes y patógenos en alimentos.*
- Quintero, P., Campos, F., Carriel, V., Alaminos, M., Sánchez, M., & Martín, M. (2017). Type I and type VII agarose characterization for use in tissue engineering. *Actualidad Médica*, 102(802), 145–150. <https://doi.org/10.15568/am.2017.802.or03>
- Ramírez, J., Medina, Y., & Uscanga, I. (2018). *Manual de laboratorio de Microbiología.*
- Rodríguez. (2004). *Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (Elisa), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en “Foie Gras.”* Universidad Complutense de Madrid.
- Silvia, Santos Preciado, J. I., Morfín Otero, M. del R., Torres López, F. J., & Alcántar Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2). <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Soler. (2009). *Diversidad genética de la colección núcleo de silvestres de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) analizados mediante microsatélites fluorescentes* Álvaro Soler Garzón universidad Tolima facultad de ciencias básicas programa de biología.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real (Vol. 2).* www.medigraphic.org.mxwww.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx
- Tamay, Ibarra, & Velasquillo. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* (Vol. 2). www.medigraphic.org.mxwww.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx
- TM Media. (2019). *TM 171-Lysine iron agar Intended use.* www.tmmedia.in
- Valtek Diagnostics. (2017). *Agar T.S.I (Triple Sugar Iron Agar).* www.valtekdiagnostics.com
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. In *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4>
- Villacreses. (2021). *Aplicación, cálculo e importancia de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de las pruebas de diagnóstico en el laboratorio clínico.*
- Vizcaíno, G. (2017). *Importancia del cálculo de la sensibilidad, especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio.* (Vol. 23).

- Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., Huslage, K., & Sickbert-Bennett, E. (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: *Norovirus*, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*, 38(5), S25–S33. <https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2010.04.196>
- Yábar, C. (2003). *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. www.ins.gob.pe
- Yepes, M., Carrero, K., Vásquez, N., & Correa, E. (2022). Validación de PCR convencional para detectar *E. coli* O157. *Información Tecnológica*, 33(2), 3–12. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642022000200003>

Anexos

Anexo 1. Planificación del Servicio de acompañamiento Técnico (SAT)

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA <small>Dr. Leopoldo Izquierdo Pérez</small>	PLANIFICACIÓN DEL SAT		Código: F-FTC-028
			Edición: 00
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Fomento y Transferencia del Conocimiento	Proceso Interno: Gestión de la Transferencia Técnica de Conocimiento Gestión del Fomento del Conocimiento	Fecha Aprobación: 17/12/2021

NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN AUSPICIANTE

Universidad Politécnica Salesiana

LOCALIZACIÓN

Provincia: Pichincha

Ciudad: Quito

Dirección: Campus el Girón, Avenida 12 de Octubre 24-22, Quito 170143

DATOS DE LA AUTORIDAD DE LA INSTITUCIÓN AUSPICIANTE

Nombre: María Sol Villagómez Rodríguez

Cargo que ocupa dentro de la institución: Vicerrectora de Universidad Politécnica Salesiana -Sede Quito

Correo: mvillagomez@ups.edu.ec

DATOS DEL INVESTIGADOR REQUIRENTE

Nombre: Estalín Xavier Lojano Castillo

C.I.: 1725449183

Correo: estalinxavier2207@gmail.com

Teléfono celular: 099 566 7084

DATOS DEL INVESTIGADOR REQUIRENTE

Nombre: José Darío Quishpe Casa

C.I.: 175122917-8

Correo: jquishpec6@est.ups.edu.ec

Teléfono celular: 096 388 8039

DATOS DEL PUNTO FOCAL DE LA INSTITUCIÓN AUSPICIANTE

Nombre: Viviana Chiluisa Utreras

Cargo que ocupa dentro la institución: Docente ingeniería en Biotecnología, investigadora en grupo BIOARN

Teléfono: 23962800 ext. 2110

Correo: vchiluisa@ups.edu.ec

DATOS DEL TUTOR TÉCNICO DEL INSPI

Nombre: Pedro José Yépez

Cargo que ocupa dentro la institución: Analista Técnico del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos

Teléfono: 0984561883

Correo: pvepez@inspi.gob.ec

Teléfono: +593 984561883

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION EN SALUD PÚBLICA <small>Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</small>	PLANIFICACIÓN DEL SAT		Código: F-FTC-028
			Edición: 00
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Fomento y Transferencia del Conocimiento	Proceso Interno: Gestión de la Transferencia Técnica de Conocimiento Gestión del Fomento del Conocimiento	Fecha Aprobación: 17/12/2021

INDIQUE EL TEMA DEL PROYECTO DE TESIS.

Estandarización del método PCR para la identificación genotípica de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* en muestras remitidas al (CRN RAM) INSPI QUITO.

INDIQUE DENTRO DE CUÁL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DEL INSPI SE ENCUENTRA EL PROYECTO PROPUESTO.

Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) en salud pública en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez" (INSPI).

INDIQUE SI PARA EL DESARROLLO DEL TEMA VA A NECESITAR DEL INSPI CEPAS, MUESTRAS BIOLÓGICAS, DATOS.

Para la investigación se necesitará cepas de las siguientes bacterias:

- *Raoultella planticola*
- *Raoultella ornithinolytica*
- *Klebsiella oxytoca*

Las cepas pertenecerán a un periodo de tiempo comprendido entre los años 2020 y 2023. El proyecto se realizará únicamente en las instalaciones de la CZ-9 del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez" (INSPI) y las cepas con las que se trabaje no serán transportadas fuera de la institución en ningún momento.

DETALLE DE ACTIVIDADES QUE DESARROLLARÁ EL INVESTIGADOR REQUIRENTE

Las actividades que se desarrollarán durante el tiempo de realización de la investigación serán:

- Selección de los asilamientos de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*
- Identificación morfológica de las cepas seleccionadas.
- Identificación molecular de los genes bla, hdc, pehX en asilamientos de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*.
- Determinación de sensibilidad y especificidad de los genes bla, hdc, pehX.
- Evaluación de resultados.

HORARIOS DE ACTIVIDADES

Del 5 septiembre de 2023 al 25 de enero de 2024

LUNES A JUEVES: 8:00 – 13:00

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA <small>Dr. Leopoldo Izquierdo Pérez</small>	PLANIFICACIÓN DEL SAT		Código:	F-FTC-028
			Edición:	00
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Fomento y Transferencia del Conocimiento	Proceso Interno: Gestión de la Transferencia Técnica de Conocimiento Gestión del Fomento del Conocimiento	Fecha Aprobación:	17/12/2021

PLANIFICACION

Fecha de inicio: 5/ 09/ 2023

Fecha de finalización: 25 /01/2024

I. CUMPLIMIENTO DE ACTIVIDADES DEL CRONOGRAMA DE TRABAJO
(Aumentar filas de objetivos si fuere necesario)

Objetivo	# Actividades Planificadas
Objetivo 1	Estandarizar PCR convencional para la amplificación de los genes <i>bla</i> , <i>hdc</i> , <i>pehX</i> utilizados en la identificación de <i>Raoultella planticola</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i>
Objetivo 2	Determinar la especificidad de la amplificación de los genes <i>bla</i> , <i>hdc</i> , <i>pehX</i> para la identificación de microorganismos <i>Raoultella planticola</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> .
Objetivo 3	Determinar la sensibilidad para la amplificación de los genes <i>bla</i> , <i>hdc</i> , <i>pehX</i>
Objetivo 4	Desarrollar protocolo para la identificación de las bacterias <i>Raoultella planticola</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> y <i>Klebsiella oxytoca</i> mediante la amplificación de los genes <i>bla</i> , <i>hdc</i> , <i>pehX</i> por PCR.

II. CUMPLIMIENTO DE ENTREGABLES PLANIFICADOS

	Producción científica			Registro Propiedad Intelectual			Intercambio de conocimiento	
	Regional	Libros	Mundial	Industrial	Derecho de autor	Obtención Vegetal	Participación en Grupos de Investigación	Redes
Planificado	X				X		X	X
Ejecutado								

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA <small>Dr. Leopoldo Izquierdo Pérez</small>	PLANIFICACIÓN DEL SAT		Código:	F-FTC-028
			Edición:	00
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Fomento y Transferencia del Conocimiento	Proceso Interno: Gestión de la Transferencia Técnica de Conocimiento Gestión del Fomento del Conocimiento	Fecha Aprobación:	17/12/2021

EJECUCIÓN FINANCIERA

Aprobado	Ejecutado	%
NA	NA	NA

El proyecto de tesis se ejecutará de manera autofinanciada.

El INSPI proveerá para esta investigación el acceso a los laboratorios de microbiología convencional y biología molecular del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos. El proyecto de investigación se realizará utilizando los equipos del INSPI como cuantificador de DNA, termociclador, cámara de electroforesis y fotodocumentador. El manejo siempre se realizará cumpliendo las normas de bioseguridad de cada laboratorio para el manejo de equipos y aislamientos bacterianos.

PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD

Se aplicarán los instructivos de bioseguridad descritos en la intranet del INSPI en la sección de Sistemas de Calidad – Instructivos – Técnicos – Bioseguridad.

- EDC 01 Lavado y desinfección de manos código I-ACI-002
- ED 01 Uso de Protección Personal código I-ACI-004
- EDC 02 Limpieza y Desinfección código I-ACI-005
- EDC 01 Manejo y Eliminación de Desechos código I-ACI-006

Protocolo de Bioseguridad para Laboratorio

- **Indumentaria y Equipos de Protección Personal**
 - Todo el personal debe utilizar bata de laboratorio de manga larga, guantes de nitrilo, gafas de seguridad y calzado cerrado durante todo momento en el laboratorio.
 - Se deben usar batas desechables para trabajos con sustancias peligrosas.
 - El uso de mascarilla puede ser requerido para ciertos procedimientos que generen aerosoles o partículas.
- **Manipulación de muestras biológicas, superficies de trabajo y equipos**
 - Tratar todas las muestras biológicas como potencialmente infecciosas.
 - Utilizar equipos de protección personal (EPP) al trabajar con muestras biológicas.
 - Desinfectar adecuadamente las superficies.
 - Mantener limpias y desinfectadas las superficies de trabajo antes y después de cada uso.
 - Anotarse siempre al utilizar los equipos en los registros de calidad de uso de equipos.

Página 4 | 5

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA <small>Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</small>	PLANIFICACIÓN DEL SAT		Código: F-FTC-028
			Edición: 00
	Macro-Proceso: Dirección Técnica de Fomento y Transferencia del Conocimiento	Proceso Interno: Gestión de la Transferencia Técnica de Conocimiento Gestión del Fomento del Conocimiento	Fecha Aprobación: 17/12/2021



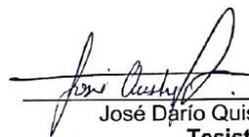
Ing. Pedro José Yépez
Tutor técnico INSPI



Eco. Milena Valdiviezo
Director técnico



Estalin Xavier Lozano Castillo
Tesisista



José Darío Quishpe Casa
Tesisista



MSc. Viviana Chiluisa Utreras
Tutor académico

Anexo 2. Codificación individual de las cepas utilizadas

N°	Código	Microorganismo
1	A-001	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
2	A-002	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
3	A-003	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
4	B-001	<i>Raoultella planticola</i>
5	C-001	<i>Klebsiella oxytoca</i>
6	C-002	<i>Klebsiella oxytoca</i>
7	D-001	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	D-002	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	E-001	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	E-002	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
11	F-001	<i>Salmonella typhi</i>
12	F-002	<i>Salmonella typhi</i>
13	G-001	<i>Klebsiella aerogenes</i>
14	G-002	<i>Klebsiella aerogenes</i>
15	H-001	<i>Shigella flexneri</i>
16	I-001	<i>Shigella sonnei</i>
17	J-001	<i>Serratia marcescens</i>
18	J-002	<i>Serratia marcescens</i>
19	K-001	<i>Escherichia coli</i>
20	K-002	<i>Escherichia coli</i>

Nota: Elaborado por: (Los autores, 2023)

Anexo 3. Valores de concentración y calidad de ADN por cuantificación

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
1	blanco	kchavez	06/12/2023 10:40:32	-0,1	ng/μl	-0,002	0,004	-0,43	0,25	DNA
2	1051- kpn	kchavez	06/12/2023 10:42:42	101,7	ng/μl	2,033	1,076	1,89	2,06	DNA
3	1052-kpn	kchavez	06/12/2023 10:43:29	31,2	ng/μl	0,624	0,387	1,61	0,81	DNA
4	1053-pae	kchavez	06/12/2023 10:44:44	5,8	ng/μl	0,116	0,058	1,98	-2,69	DNA
5	1053-pae rep	kchavez	06/12/2023 10:45:19	6,2	ng/μl	0,124	0,037	3,36	-1,79	DNA
6	1054-pae	kchavez	06/12/2023 10:46:04	18,5	ng/μl	0,371	0,167	2,22	4,76	DNA
7	1059-salmo	kchavez	06/12/2023 10:46:40	7,8	ng/μl	0,157	0,079	1,99	-4,57	DNA
8	1062-salmo	kchavez	06/12/2023 10:47:16	255,6	ng/μl	5,112	2,715	1,88	1,49	DNA
9	673-kae	kchavez	06/12/2023 10:47:51	94,3	ng/μl	1,885	0,980	1,92	1,85	DNA
10	718-kae	kchavez	06/12/2023 10:48:30	169,0	ng/μl	3,380	1,732	1,95	1,24	DNA
11	61-shigella flex	kchavez	06/12/2023 10:49:19	85,6	ng/μl	1,711	0,901	1,90	1,38	DNA
12	263-shigella sonnei	kchavez	06/12/2023 10:49:50	3,2	ng/μl	0,063	0,037	1,72	0,25	DNA
13	263-shigella sonn rep	kchavez	06/12/2023 10:50:52	6,2	ng/μl	0,124	0,090	1,37	2,36	DNA
14	842-sma	kchavez	06/12/2023 10:51:25	56,0	ng/μl	1,119	0,557	2,01	1,63	DNA
15	923-sma	kchavez	06/12/2023 10:51:57	21,3	ng/μl	0,426	0,257	1,66	3,88	DNA
16	871-eco	kchavez	06/12/2023 10:52:28	6,8	ng/μl	0,136	0,079	1,72	-4,46	DNA
17	871-eco rep	kchavez	06/12/2023 10:53:02	7,4	ng/μl	0,148	0,055	2,71	-10,19	DNA
18	904-eco	kchavez	06/12/2023 10:53:37	25,7	ng/μl	0,515	0,272	1,89	0,68	DNA
19	2123-orni	kchavez	06/12/2023 10:54:19	584,3	ng/μl	11,686	5,718	2,04	2,40	DNA
20	1308-plant	kchavez	06/12/2023 10:55:16	539,2	ng/μl	10,785	5,460	1,98	2,22	DNA
21	1181-kox	kchavez	06/12/2023 10:55:57	745,6	ng/μl	14,912	7,712	1,93	1,45	DNA
22	1613-kox	kchavez	06/12/2023 10:57:02	638,2	ng/μl	12,764	6,326	2,02	1,29	DNA
23	440-plant	kchavez	06/12/2023 10:57:38	200,4	ng/μl	4,009	2,244	1,79	1,68	DNA
24	2131-plant	kchavez	06/12/2023 10:58:09	18,5	ng/μl	0,370	0,195	1,89	0,70	DNA
25	2131-plant rep	kchavez	06/12/2023 10:58:40	14,4	ng/μl	0,287	0,168	1,71	0,83	DNA
26	2055-orni	kchavez	06/12/2023 10:59:14	221,5	ng/μl	4,430	2,515	1,76	0,89	DNA
27	344-plant	kchavez	06/12/2023 11:00:44	365,7	ng/μl	7,314	3,911	1,87	1,81	DNA
28	35-plant	kchavez	06/12/2023 11:01:20	396,4	ng/μl	7,928	4,191	1,89	1,75	DNA
29	2123-plant quick	kchavez	06/12/2023 11:01:56	292,3	ng/μl	5,845	2,987	1,96	1,27	DNA

4	2011R. planticola	kchavez	21/12/2023 9:34	1463,8	ng/μl	29,278	13,757	2,13	2,08	DNA
---	-------------------	---------	-----------------	--------	-------	--------	--------	------	------	-----

Nota: Elaborado por: (Los autores, 2023)

Anexo 4. Disposición de muestras en el gel en ensayo de especificidad

1	MP	MP
2	<i>Kleb (A) 1 hdc</i>	
3	<i>Kleb (A) 2 hdc</i>	
4	<i>Pae 1 hdc</i>	
5	<i>Pae 2 hdc</i>	
6	<i>Salm 1 hdc</i>	
7	<i>Salm 2 hdc</i>	
8	<i>Kleb (B) 1 hdc</i>	
9	<i>Kleb (B) 2 hdc</i>	
10	<i>Shig 1 hdc</i>	
11	<i>Shig 2 hdc</i>	
12	<i>Sma 1 hdc</i>	
13	<i>Sma 2 hdc</i>	-
14	<i>Eco 1 hdc</i>	
15	<i>Eco 2 hdc</i>	
16	<i>R. orni hdc</i>	
17	<i>R. plant hdc</i>	
18	<i>Kox hdc</i>	
19	<i>C- hdc</i>	
20	<i>Kleb (A) 1 pehx</i>	
21	<i>Kleb (A) 2 pehx</i>	
22	<i>Pae 1 pehx</i>	
23	<i>Pae 2 pehx</i>	
24	<i>Salm 1 pehx</i>	
25	<i>Salm 2 pehx</i>	
26	<i>Kleb (B) 1 pehx</i>	<i>Kleb (A) 1 bla</i>
27	<i>Kleb (B) 2 pehx</i>	<i>Kleb (A) 2 bla</i>
28	<i>Shig 1 pehx</i>	<i>Pae 1 bla</i>
29	<i>Shig 2 pehx</i>	<i>Pae 2 bla</i>
30	<i>Sma 1 pehx</i>	<i>Salm 1 bla</i>
31	<i>Sma 2 pehx</i>	<i>Salm 2 bla</i>
32	<i>Eco 1 pehx</i>	<i>Kleb (B) 1 bla</i>
33	<i>Eco 2 pehx</i>	<i>Kleb (B) 2 bla</i>
34	<i>R. orni pehx</i>	<i>Shig 1 bla</i>
35	<i>R. plant pehx</i>	<i>Shig 2 bla</i>
36	<i>Kox pehx</i>	<i>Sma 1 bla</i>
37	<i>C- pehx</i>	<i>Sma 2 bla</i>
38	-	<i>Eco 1 bla</i>
39	-	<i>Eco 2 bla</i>
40	-	<i>R. orni bla</i>
41	-	<i>R. plant bla</i>
42	-	<i>Kox bla</i>
43	-	<i>C- bla</i>

Nota: Elaborado por: (Los autores, 2023)

MP: Marcador de peso molecular. *Kleb (A)*: *Klebsiella pneumoniae*. *Kleb (B)*: *Klebsiella aerogenes*. *Pae*: *Pseudomona*. *Salm*: *Salmonella*. *Shig*: *Shigella*. *Sma*: *Serratia marcescens*. *Eco*: *Escherichia coli*. *R orni*: *Raoultella ornithinolytica*. *R plant*: *Raoultella planticola*. *Kox*: *Klebsiella oxytoca*. C+: Control positivo. C-: Control negativo.

Anexo 5. Cepas destinadas a ensayos de especificidad

Género	Especie
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (D-001)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (D-002)
	<i>Klebsiella aerogenes</i> (G-001)
	<i>Klebsiella aerogenes</i> (G-002)
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (E-001)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (E-002)
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i> (F-001)
	<i>Salmonella typhi</i> (F-002)
<i>Shigella</i>	<i>Shigella flexneri</i> (H-001)
	<i>Shigella sonnei</i> (I-001)
<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i> (J-001)
	<i>Serratia marcescens</i> (J-002)
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i> (K-001)
	<i>Escherichia coli</i> (K-002)