



REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, UJED

CONQUILAB UJED Facultad de Ciencias Químicas UJED CMC LatC IFCC COLABIOCLI

11 CONGRESO INTERNACIONAL CONQUILAB Y EXPOINNOVACIÓN TECNOLÓGICA

JORNADAS ACADÉMICAS VIRTUALES
28 AL 30 OCTUBRE 2021

EXPOINNOVACIÓN
TECNOLÓGICA

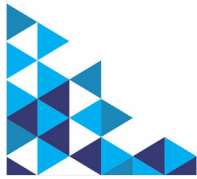
SIMPOSIOS

TALLERES

TRABAJOS
LIBRES

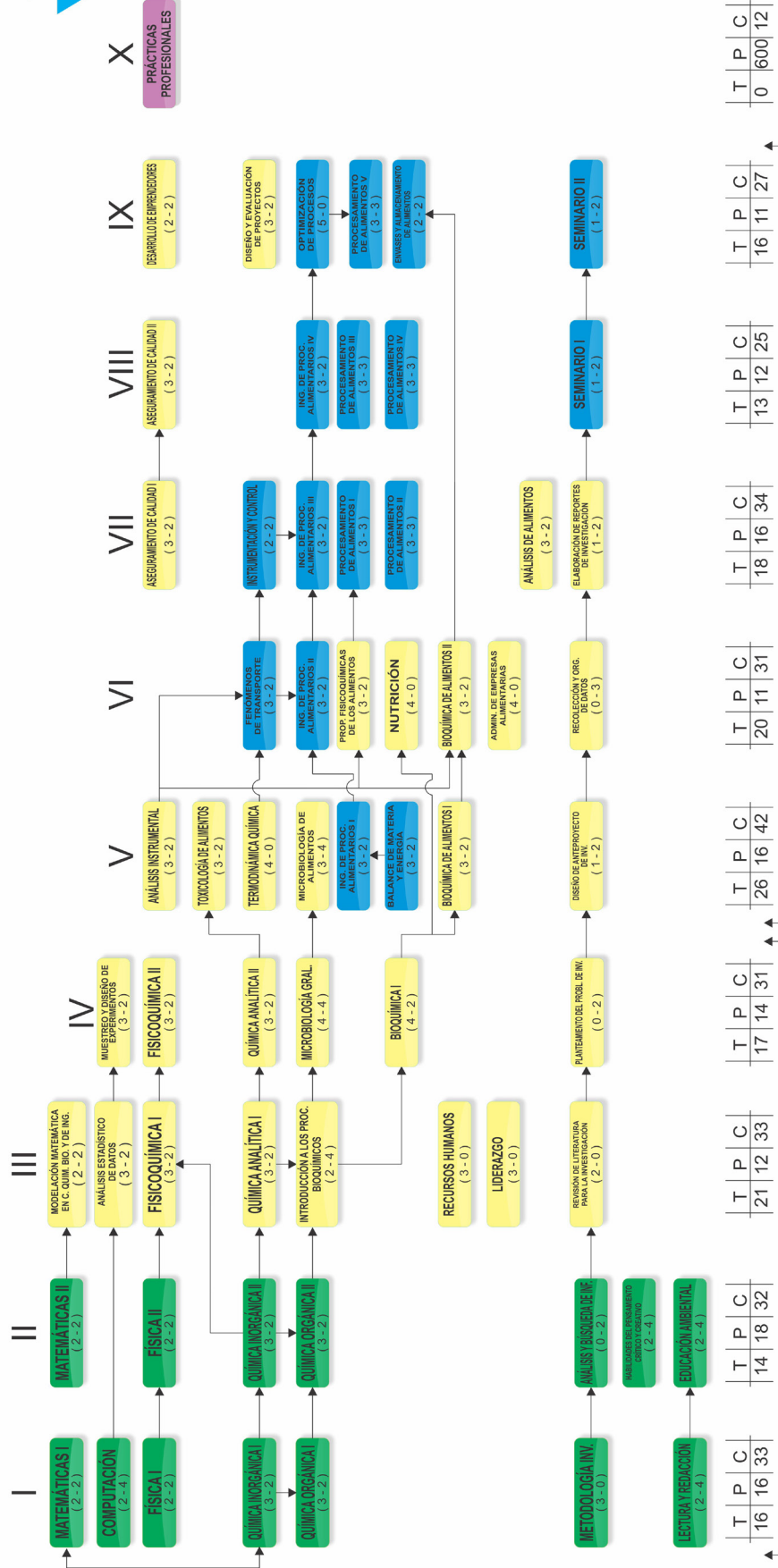
CONFERENCIAS
MAGISTRALES

Volumen 2
2° Número Especial
Diciembre 2021
ISSN: 2594-1445



INGENIERÍA QUÍMICA EN ALIMENTOS

MAPA CURRICULAR



FORMACIÓN INTEGRAL

ACTIVIDADES DE VINCULACIÓN

- FORMACIÓN INTELLECTUAL: 8 CRÉDITOS.
- FORMACIÓN CULTURAL Y DEPORTE: 6 | 0 | 6
- ÁREA BÁSICA: 6 | 0 | 6
- ÁREA DISCIPLINAR: 26 | 16 | 42
- EJERCICIO PROFESIONAL: 20 | 11 | 31
- OPTATIVAS: 18 | 16 | 34
- SERVICIO SOCIAL: 13 | 12 | 25
- FORMACIÓN PROFESIONAL: 16 | 11 | 27
- PRÁCTICAS PROF. EXP. RECEP.: 10 CRÉDITOS.
- EXP. RECEP.: 4 CRÉDITOS.

REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

CINTILLO LEGAL

Revista Mexicana de Industria y Salud, año 7 No. 3 (mayo - octubre), es una publicación semestral editada por la Universidad Juárez del Estado de Durango a través de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicada en Av. Artículo 123 S/N Colonia Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010. Tel (871) 715 8810 ext. 118, www.fcqgp.ujed.mx/remdis, editorremdis@gmail.com, symposiumfcqujed@gmail.com.

Editor responsable: M. C. Mónica Andrea Valdez Solana. Reserva de derechos al uso exclusivo (en trámite), ISSN 2594-1445, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Lic. Luis Antonio Montoya Jáquez, Departamento de informática de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicado en Av. Artículo 123 S/N Col. Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010, fecha de última actualización 17 de diciembre de 2021.

Consejo Editorial

Juan Pablo Pardo Vázquez
Bioquímica; Facultad de Medicina, UNAM

Oscar Flores Herrera
Bioquímica; Facultad de Medicina, UNAM

Erick Sierra Campos
Biotecnología médica; Facultad de Ciencias Químicas
Gómez Palacio, UJED

Alfredo Téllez Valencia
Medicina molecular; Facultad de Medicina, Durango,
UJED

Claudia Avitia Domínguez
Medicina molecular; Facultad de Medicina, Durango,
UJED

Jaime Héctor Gómez Zamudio
Farmacéutica; Centro Médico Nacional, Siglo XXI

Martha Lucia Lázaro Suárez
Farmacéutica; Centro Médico Nacional, Siglo XXI

Graciela Castro Escarpulli
Microbiología; Depto. Bacteriología médica,
ENCB IPN

Jorge Alberto González Merchand
Microbiología; Dpto. Microbiología Molecular,
ENCB IPN

Director editorial
Mónica Andrea Valdez Solana

Asistencia editorial
Francisco Carlos López Márquez
Erick Sierra Campos

Diseño
Luis Antonio Montoya Jáquez



Directorio Institucional

M.A. Rubén Solís Ríos
Rector

M.C. Julio Gerardo Lozoya Vélez
Secretario General

Dr. Jesús Espinosa Flores
Contralor General

Dr. José Othón Huerta Herrera
Subsecretario General Académico

Dr. Juan José Martínez García
Director de la Facultad de Ciencias Químicas GP

Lic. Daisy Virginia Rivas Govea
Secretaria Administrativa

M.C. Verónica Yazmín Mejía García
Secretaria Académica

Dra. Concepción García Luján
*Jefa de la División de Estudios de Posgrado e
Investigación*

Dr. José de Jesús Alba Romero
Coordinador de Investigación

Dr. José Rafael Minjares Fuentes
Coordinador Académico

Contenido

EDITORIAL	vi
BIOQUÍMICA	01
Caracterización cinética de la catalasa perteneciente a <i>Rhodococcus equi</i> multirresistente y efecto inhibitorio de la <i>Moringa oleifera</i>	2
Valdez-Solana Mónica A, Suárez-Adame Brenda Anahí, Ventura-García Erica K. y Sierra Campos Erick.	
Detección <i>in silico</i> del integrón clase IV en <i>Aeromonas caviae</i> In silico detection of class IV integron in <i>Aeromonas caviae</i>	12
Pelcastre-Rodríguez Leda Ivonne, Morales-Luna Lucia, Hernández-Cortez Cecilia, Colmenero-Solís Raúl de Jesús, Arzate-Barbosa Patricia, Castro-Escarpulli Graciela.	
CIENCIAS BIOMÉDICAS	25
Análisis de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia del género <i>Klebsiella</i> en muestras clínicas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados de un Sanatorio del Norte de México	26
Alba-Romero José de Jesús, Sánchez-De León Elías Isaac, Mora-Valenzuela Marco Antonio, Martínez-Valle Daniel Said, Nava-Facio José Alfredo, Martínez-Romero Aurora.	
MICROBIOLOGÍA	35
Aislamiento de los miembros de la Tribu <i>Klebsielleae</i> obtenidos de suelos cercanos a hospitales y su persistencia en acero inoxidable	36
Saldaña-Padilla Andrés, Carrillo-Chavez Karla, Colmenero-Solís Raúl de Jesús, Hernández-Cortez Cecilia, Gonzalez-Avila Luis Uriel, Castro-Escarpulli Graciela.	
Evaluación de la formación de biopelícula en cepas de <i>Aeromonas</i> spp., aisladas de carne de pollo	44
Gonzalez-Avila Luis Uriel, Villanueva-González Kirvi Daniel, Martínez-Trejo Arturo, Colmenero- Solís Raúl de Jesús, Castro-Escarpulli Graciela, Hernández-Cortez Cecilia	

Editorial

El Colegio Nacional de Químicos Clínicos en Medicina de Laboratorio, A.C. CONQUILAB tiene el placer de invitarlos a participar en el II Congreso Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio y Expoinnovación Tecnológica, que se llevará a cabo de manera virtual del 28 al 30 de octubre del presente año.

Estoy seguro de que hemos organizado un Congreso Científico de muy alta calidad.

Nos apena que por segunda vez y de manera consecutiva hayamos tenido que hacer el Congreso en modalidad virtual, pero las condiciones propias de la pandemia y la seguridad de los participantes nos impiden realizar eventos presenciales de esta magnitud.

Sin embargo, esta modalidad tiene la ventaja de tener acceso a grandes profesores nacionales e internacionales con un prestigio irrefutable. Otra gran ventaja es que, aunque se hayan inscrito sólo una parte del programa científico, tendrán la oportunidad de disfrutarlo posteriormente por tiempo limitado en el momento más conveniente para ustedes.

El programa científico está conformado por conferencias magistrales, simposios, conferencias, talleres y trabajos libres en modalidades estudiantil y profesionalizante. Naturalmente con temas de actualidad y tratando de cubrir todas las áreas de la medicina de laboratorio.

Así mismo, contaremos con la presencia de la industria en una modalidad 3D, en la que los proveedores presentarán lo más actual y novedoso de sus productos.

Creo que el Congreso es una gran oportunidad para adquirir o complementar conocimientos que sin duda podrán aplicar en su desempeño profesional.

Los esperamos con mucho gusto a aprovechar y disfrutar de este magno evento.

Atentamente

Dr. Jesús Norberto Lozano Ruiz Esparza
Presidente CONQUILAB



Universidad Juárez del Estado
de Durango



Facultad de Ciencias Químicas
Gómez Palacio

MISIÓN

Formar personas competentes en el área de ciencias químicas, con sentido humano, científico y social que propicien el bienestar regional, estatal y nacional.

VISIÓN

Ser una facultad adaptable a las circunstancias nacionales y globales ofreciendo programas educativos de calidad, con personal docente y administrativo competente a través de la actualización dinámica en un ambiente armónico

BIOQUÍMICA

(Bioenergética, proteínas, metabolismo, productos bioactivos)



"Una cabeza sin memoria es como una plaza sin guarnición"
Napoleón Bonaparte (1769-1821); emperador de Francia.

Caracterización cinética de la catalasa perteneciente a *Rhodococcus equi* multirresistente y efecto inhibitorio de la *Moringa oleifera*.

¹Valdez-Solana Mónica A, ¹Suárez-Adame Brenda Anahí, ¹Ventura-García Erica K. y ¹Sierra Campos Erick.

¹Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n Fracc, Filadelfia, 35010 Gómez Palacio, Dgo.

*Email: ericksier@ujed.mx

RESUMEN

Este estudio demostró que *Rhodococcus equi* es resistente a Eritromicina, Ampicilina, Tetraciclina y Dicloxacilina. En el zimograma a una baja concentración se obtuvo la actividad de una catalasa, y a una alta concentración se observaron 2 bandas de actividad, la banda de tamaño mediano representa el 83.91% y la banda de alto peso corresponde al 16.08% de la actividad total. También se determinó el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la catalasa y se ajustó por mínimos cuadrados para calcular los parámetros cinéticos $K_m = 57.37$ mM y $V_{max} = 255.57$ UCA. Esta catalasa se inhibió un 99.48% con KCN, 99.30% con azida sodio y 74.02% con 3-aminotriazol, mientras que con los extractos de hoja de *Moringa oleifera* se encontró un porcentaje de inhibición del 35.86% y 4.80%, respectivamente. Estos resultados enfatizan la importancia que tiene la catalasa en esta bacteria y su posibilidad de ser un nuevo blanco terapéutico contra las cepas de *R. equi* multirresistentes.

Palabras Claves: *Rhodococcus equi*, catalasa, *Moringa oleifera*.

ABSTRACT

This study demonstrated that *Rhodococcus equi* is resistant to Erythromycin, Ampicillin, Tetracycline, and Dicloxacillin. In the zymogram at a low concentration, the activity of a catalase was obtained, and at a high concentration, 2 bands of activity were observed, the medium-sized band represents 83.91% and the high-weight band corresponds to 16.08% of the total activity, in the enzymatic activity of catalase, the effect of the substrate concentration on the activity of catalase and adjustment by least squares, the kinetic parameters were $K_m = 57.37$ mM and $V_{max} = 255.57$ UCA. It was inhibited 99.48% with KCN, 99.30% with sodium azide and 74.02% with 3-aminotriazole, while with *Moringa oleifera* leaf extracts was found an inhibition percentage of 35.86% and 4.80%, respectively. These results emphasize the importance of catalase in this bacterium and its possibility of being a new therapeutic target against multi-resistant strains of *R. equi*.

Keywords: *Rhodococcus equi*, catalase, *Moringa oleifera*.

INTRODUCCIÓN

Rhodococcus equi es una bacteria patógena, oportunista capaz de generar resistencia, afectando principalmente a personas inmunocomprometidas y animales de granja (Collingbon PC y cols., 2016). Esta bacteria presenta un sistema de defensa antioxidante muy dinámico, asegurando su persistencia y multiplicación dentro del ambiente altamente oxidativo por macrófagos. *R. equi* puede sobrevivir dentro de los macrófagos, y dicha supervivencia intracelular está mediada por diferentes miembros de una familia de megaplasmidos, conocidos como pVAP (Valero-Rello A y cols., 2015). Las islas de patogenicidad de los plásmidos pVAP comprenden varios genes que codifican proteínas asociadas a la virulencia (Vaps), siendo VapA el más estudiado (Letek M y cols., 2008). En particular, se sabe que se requiere VapA para conservar un pH neutro dentro del fagolisosoma que contiene *R. equi* (von Bargen K y cols., 2019).

R. equi puede sobrevivir dentro de los macrófagos, y dicha supervivencia intracelular está mediada por diferentes miembros de una familia de megaplasmidos, conocidos como pVAP (Valero-Rello A y cols., 2015). Las islas de patogenicidad de los plásmidos pVAP comprenden varios genes que codifican proteínas asociadas a la virulencia (Vaps), siendo VapA el más estudiado (Letek M y cols., 2008). En particular, se sabe que se requiere VapA para conservar un pH neutro dentro del fagolisosoma que contiene *R. equi* (von Bargen K y cols., 2019). Además, estos mecanismos de defensa incluyen enzimas como la catalasa, que cataliza la

descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua. Por tanto, los compuestos antibacterianos que provocan estrés oxidativo son nuevas estrategias contra *R. equi* (Bidaud P y cols., 2012).

Por otra parte, el árbol de *Moringa oleifera* ha mostrado que sus componentes fitoquímicos presentan propiedades antimicrobinas y posiblemente pueden interactuar con los sistemas antioxidantes bacterianos para favorecer el daño oxidativo.

Las actividades farmacológicas y los compuestos medicinales considerables de *M. oleifera* tienen un alto efecto antibacteriano en comparación con el antibiótico *TE de amplio espectro* (Opara, AU y cols., 2015). Hoy en día, la mayoría de las bacterias son resistentes a múltiples fármacos (Labella A y cols., 2013; Ramey AM y Ahlstrom CA., 2020). Los antioxidantes naturales como el ácido ascórbico, los flavonoides, los fenólicos y los carotenoides se obtienen de las hojas de *Moringa oleifera* (Valdez-Solana MA y cols., 2015). Se informó que tienen nuevos compuestos activos que poseen un efecto antibacteriano y pueden superar el problema de la resistencia a múltiples fármacos (Dzotam JK y cols., 2016). Por tanto, *M. oleifera* se considera una de las nuevas estrategias de lucha contra las infecciones en el control de bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos. Además, tiene un amplio margen de seguridad para el consumo humano y animal. En base a la información anterior se planteó el objetivo de determinar la multirresistencia de *R. equi* y realizar la caracterización cinética de su principal catalasa y evaluar el efecto inhibitorio del extracto de la hoja de *M. oleifera* (Figura 1).

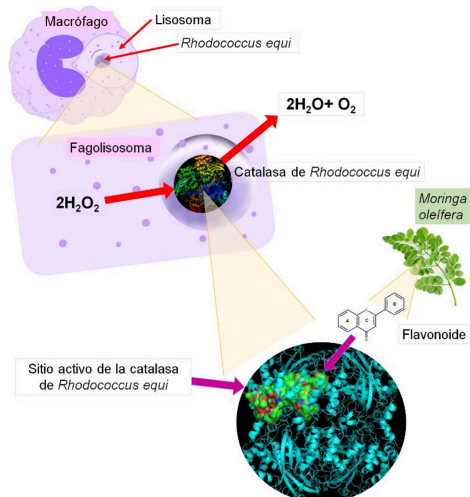


Figura 1. Esquema hipotético del posible mecanismo de acción de los componentes de la *M. oleifera* sobre la catalasa de *R. equi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *Rhodococcus equi* fue aislada del tracto digestivo de aves comerciales del "Aviario la güera", ubicado en León Guanajuato, México en el 2018.

Inóculo para crecimiento de *R. equi*

Se colocó 1 vial de *R. equi* en un tubo con rosca que contenía 3 mL de medio YPD (Yeast Extract–Peptone–Dextrose), se incubó a 35°C por 24h y posteriormente se empleó para evaluar la resistencia de *Rhodococcus equi* en una placa con agar Müeller Hinton en presencia de un antibiograma disco-placa con los antibióticos: Ampicilina, Cefotaxima, Ciprofloxacino, Clindamicina, Eritromicina, Penicilina, Tetraciclina, Cefalotina, Dicloxacilina, Gentamicina, Trimetoprima/Sulfametoxazol y Vancomicina.

Obtención de células para análisis de catalasa

Se utilizaron dos viales de la cepa y se inoculó en dos tubos, cada uno con 3 mL de medio YPD y se dejó crecer en agitación por 24h a temperatura ambiente. Posteriormente el crecimiento se transvaso a dos matraces Erlenmeyer de 50 mL cada uno y con medio YPD, se dejaron en agitación en una parrilla magnética a las mismas condiciones, con la finalidad de aumentar la biomasa. El crecimiento se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y a 4°C, se recolectó el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió con 4 mL de buffer de 50 mM de fosfatos (pH 7), se disolvió mezclando con un pincel. Después se recolectó la suspensión en tubos eppendorf de 1.5mL. Se utilizaron dos tubos para romper las membranas bacterianas con perlas de vidrio mediante 10 ciclos donde se colocó el tubo en el vortex por 1 min y después en frío por 3 min entre cada ciclo. Se centrifugaron los tubos que contienen las perlas de vidrio en microcentrifugas a máxima velocidad por 5 min y se extrajo el sobrenadante en otros tubos eppendorf y se almacenó a -12°C hasta su uso.

La actividad de catalasa

La actividad de CAT se midió mediante el procedimiento espectrofotométrico descrito por Beers & Sizer (1952). La actividad CAT se midió como absorción ultravioleta de H₂O₂. La actividad se calculó a partir de la tasa de disminución de la absorbancia, usando ΔA_{240nm} durante 1 min en amortiguador de fosfato 50 mM (pH 7,0) en una cubeta de cuarzo de 1 cm y normalizado con

la proteína celular total en el extracto. La actividad se expresó como unidades por mg de proteína. Además, se evaluaron las inhibiciones de: Cianuro de potasio (KCN) 1mM, 3-Aminotriazol (C₂H₄N₄) 0.5mM, Azida Sodio (NaN₃) 0.5mM y extractos de hoja de *Moringa oleifera* hidroalcohólico (Ex H) (en metanol al 80%) y acuoso (Ex Ac).

Actividad CAT en gel nativo

La actividad de CAT en gel nativo se analizó utilizando el protocolo descrito por Pezzoni y cols., (2016). Extractos libres de células se resolvió en PAGE al 6% nativo en buffer Tris-glicina. Se añadió una cantidad igual de proteína a cada pocillo. Condiciones de funcionamiento fueron las siguientes: 4 ha 15 mA a 4 °C. El gel se sumergió en 30 ml de solución de H₂O₂ 10 mM preparada en buffer de fosfato 50 mM (pH 7,0), para 15 min o hasta que se formen pequeñas burbujas de oxígeno. El tampón de fosfato se retiró y el gel se enjuagó con agua destilada para eliminar H₂O₂ residual. A continuación, el gel se sumergió en 30 ml de cloruro férrico al 1% y ferricianuro de potasio al 1%. La mezcla se decantó y el gel se lavó con agua inmediatamente después de que aparecieran las bandas de actividad de catalasa.

RESULTADOS

El tratamiento de rhodococcosis consiste de la combinación de al menos dos antibióticos para los cuales la bacteria es susceptible. Entre los antibióticos empleados se tienen los macrólidos, rifampicina, fluoroquinolonas, aminoglucosidos, glicopeptidos y carbapenems, aunque se ha reportado el aumento de resistencia a rifampicina y eritromicina (Giguère, S y cols., 2017). Por tanto, *R. equi* presenta múltiples mecanismos de resistencia a quinolonas, sulfametoxazol, rifampicina y beta-lactámicos.

Existe una necesidad de búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en bacterias multirresistentes. En el caso de *R. equi* se conoce que posee 4 isoformas de catalasa que son importantes en condiciones de estrés oxidativo (Bidaud P y cols., 2012). Sin embargo, no se conocen los parámetros cinéticos de estas proteínas y si alguna de ellas es constitutiva y podría representar un potencial blanco terapéutico. *R. equi* es resistente a Eritromicina, Ampicilina, Tetraciclina y Dicloxacilina (Figura 2).

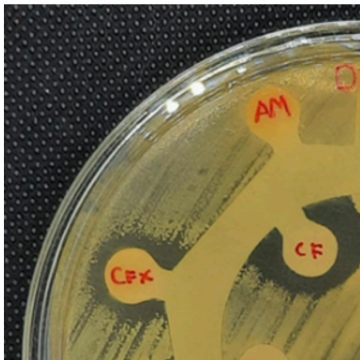


Figura 2. Antibiograma disco-placa de *Rhodococcus equi*, la cual resulta resistente a Eritromicina, Ampicilina, Tetraciclina y Dicloxacilina.

Rhodococcus equi presenta cuatro potenciales catalasas y algunas de ellas son inducidas por la presencia de H_2O_2 . Sin embargo, no existe literatura sobre la actividad de catalasa en condiciones aerobias. Por lo cual, se realizó un ensayo de actividad en gel para conocer el posible número de isoformas que están participando en el consumo de H_2O_2 . En el zimograma a una baja concentración de proteína ($3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) solo se obtuvo la actividad de una catalasa, y a una alta concentración de proteína ($70 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) se observaron 2 bandas de actividad, la banda de tamaño mediano representa el 83.91% y la banda de alto peso corresponde al 16.08% de la actividad total (Figura 3). Estos datos sugieren que la banda de tamaño mediano es la principal catalasa en condiciones aerobias.

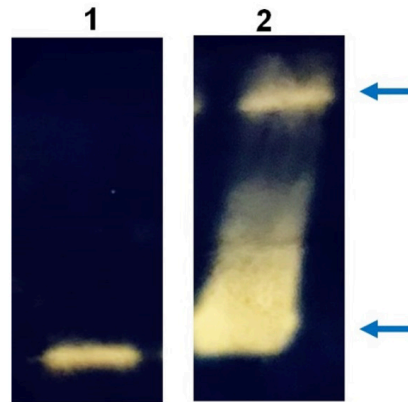


Figura 3. Actividad en gel de catalasa a diferentes concentraciones de proteína. A baja concentración, la actividad depende de una catalasa (carril 1). Mientras que a alta concentración se observan 2 bandas de actividad (carril 2), la banda de tamaño mediano representa el 83.91% y la banda de alto peso corresponde al 16.08% de la actividad total.

La principal catalasa de *R. equi* es de alta capacidad debido a que requiere altas concentraciones de H_2O_2 y consume 20 mM del sustrato en menos de 30 segundos. Por tanto, es difícil realizar su medición debido a que a muy bajas cantidades de proteína ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) consume muy rápido el H_2O_2 y esto provoca la aparición de burbujas de oxígeno en la celda y causa lecturas fluctuantes durante los cursos temporales. Además, fue imposible realizar ensayos de punto final debido a que el H_2O_2 tiene un pico máximo a 240 nm y cuya lectura no cambia a diferentes concentraciones crecientes de sustrato (Figura 4A). Por tanto, se decidió realizar barridos

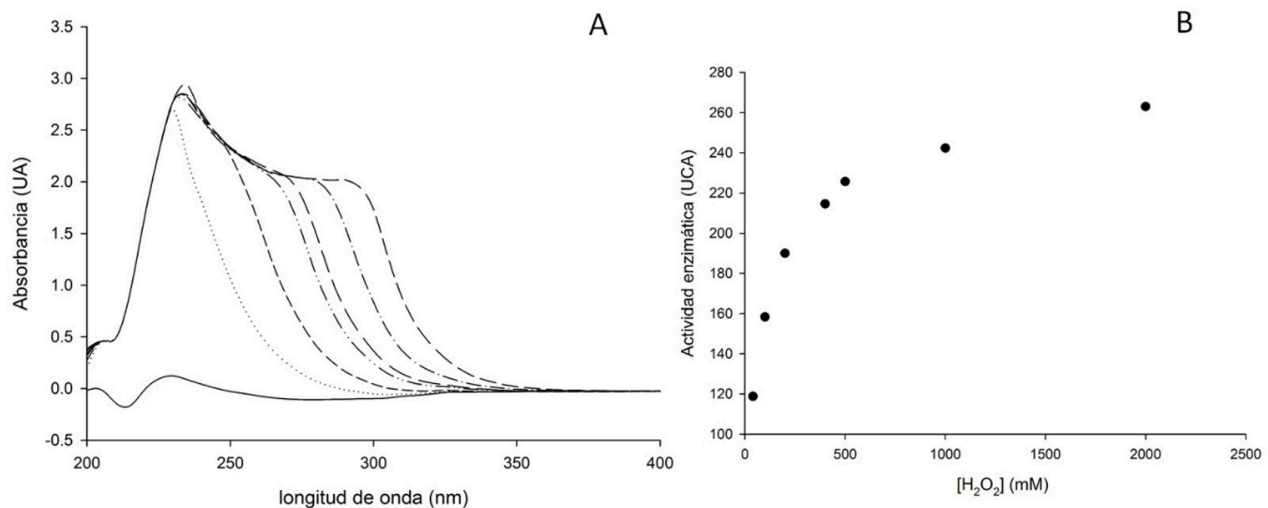


Figura 4. A) Barridos temporales de Peróxido de hidrógeno de la catalasa de *R. equi*. B) Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la catalasa y ajuste por mínimos cuadrados (hipérbola rectangular). Los parámetros cinéticos fueron $K_m = 57.37 \text{ mM}$ y $V_{max} = 255.57 \text{ UCA}$.

de 200-400 nm y medir el área bajo la curva para posteriormente determinar la concentración de sustrato residual y emplear la ecuación de primer orden para calcular la actividad total de la enzima.

Para la catalasa de tamaño mediano se realizó su caracterización cinética al evaluar el efecto de la concentración del sustrato (H_2O_2) sobre la actividad de la enzima y los datos se ajustaron por mínimos cuadrados, los parámetros cinéticos fueron $K_m = 57.37$ mM y $V_{max} = 255.57$ UCA (Figura 4B). Se inhibió el 99.48% con KCN, 99.30% con NaN_3 y 74.02% con 3-Aminotriazol, mientras que con los extractos de hoja de *M. oleifera* se encontró un porcentaje de inhibición del 35.86% y 4.80%, respectivamente.

DISCUSION

La resistencia de *Rhodococcus equi* refleja la necesidad de estudiar nuevos agentes microbianos sobre nuevos blancos terapéuticos, como la catalasa. Los resultados mostraron que *Rhodococcus equi* multirresistente presenta dos catalasas constitutivas que son sensibles a los inhibidores clásicos de hemoproteínas (KCN y NaN_3) y al inhibidor específico (3-Aminotriazol). Además, los extractos de *M. oleifera* poseen moléculas que inhiben esta enzima y demuestran su uso contra bacterias multirresistentes. Sin embargo, se requieren más estudios para conocer que fitoquímicos actúan como inhibidores de la catalasa.

Dado que *R. equi* y *Mycobacterium* spp. pertenecen al taxón mycolata es razonable especular que la infección por *R. equi* podría inducir la misma respuesta innata del huésped que la infección por *M. marinum*. En el 2012 se realizó un análisis preliminar de la secuencia del genoma parcial (30% de cobertura) de *Rhodococcus equi* ha revelado una serie de características importantes. El más notable fue el grado de homología de genes identificados con los de *Mycobacterium tuberculosis*. Las similitudes en la proporción de genes dedicados a la degradación de ácidos grasos y a la biosíntesis de lípidos fue un hallazgo sorprendente pero no sorprendente dada la relación de estos organismos y su éxito como patógenos intracelulares. El rápido reciente La mejora en la comprensión de la virulencia en *M. tuberculosis* y otras micobacterias patógenas ha identificado un gran número de genes de importancia putativa o probada en la virulencia, homólogos de muchos de los cuales también se identificaron en *R. equi*. Aunque *R. equi* parece

tener genes únicos en la actualidad, y tiene diferencias importantes, su similitud con *M. tuberculosis* respalda la necesidad de comprender la base de virulencia en este organismo. La secuencia del genoma parcial será un recurso para los trabajadores interesados en *R. equi* hasta el momento en que se haya caracterizado una secuencia completa del genoma (Rahman MT y cols., 2003).

Rhodococcus equi es un patógeno actinobacteriano ampliamente distribuido, el principal agente causante de neumonía en potros jóvenes (Vazquez-Boland JA y Meijer WG, 2019) y, también, un patógeno oportunista emergente en pacientes inmunodeprimidos, donde a menudo se diagnostica erróneamente (Tuon, FF y cols., 2007). *R. equi* es muy prevalente en granjas debido a su adaptación al intestino del caballo. Este patógeno intracelular facultativo se transmite al inhalar polvo del suelo contaminado o partículas respiratorias producidas por animales infectados (Muscatello, G y cols., 2006).

Los tratamientos actuales se basan en una combinación de macrólidos y rifampicina; sin embargo, se están volviendo ineficaces debido a la propagación de la resistencia a los antibióticos (Giguère, S y cols., 2017; Huber L y cols., 2018). En la literatura existe evidencia que señala múltiple resistencia de *R. equi* a una gran variedad de antibióticos, Letek y cols (2010) señala el grado de resistencia a diversos antibióticos que incluyen 13 aminoglucósidos, nueve sulfonamidas, seis tetraciclinas, 10 quinolonas, 18 b-lactámicos y cloranfenicol con respecto a *R. equi* 103S, además posee tres homólogos de la proteína similar a histona micobacteriana asociada a virulencia Lsr2 (un plásmido vap PAI codificado, REQ03140 y cromosómico 05980), y una proteína de la familia Dps (REQ14900, cotranscrita con REQ14890 que codifica un supuesto CsbD proteína de estrés), puede proteger contra el daño oxidativo del DNA. La NO reductasa REQ03280 y una supuesta NO dioxigenasa (REQ10890) pueden conferir resistencia al estrés nitrosativo.

R. equi puede sobrevivir dentro de los macrófagos, y dicha supervivencia intracelular está mediada por diferentes miembros de una familia de megaplasmidos, conocidos como pVAP (Valero-Rello A y cols., 2015). Las islas de patogenicidad de los plásmidos pVAP comprenden varios genes que codifican proteínas asociadas a la virulencia (Vaps), siendo VapA el más estudiado (Letek M y cols., 2008). En particular, se sabe que se requiere VapA para conservar un pH neutro dentro del fagolisosoma que contiene *R. equi* (von

Bargen K y cols., 2019).

No obstante, la identificación de otros factores de virulencia codificados por cromosomas se ha beneficiado enormemente de la publicación de las secuencias del genoma de diferentes cepas de *R. equi* (Anastasi, E y cols., 2016). Como consecuencia, recientemente se han asociado nuevos factores de virulencia con diferentes funciones, que van desde la captación de colesterol hasta la biosíntesis de aminoácidos (Miranda-CasoLuengo, R y cols., 2012; Van der Geize, R y cols., 2011).

Durante la infección, *R. equi* está expuesta a estrés oxidativo dentro de los macrófagos de mamíferos, que son la primera línea de defensa inmunitaria del huésped (Darrah, PA y cols., 2000). Específicamente, durante la fagocitosis, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) es extremadamente activa, lo que eventualmente causa la destrucción de bacterias engullidas (Benoit, S y cols., 2002; Chandramani-Shivalingappa, P y cols., 2017). Sin embargo, *R. equi* puede sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, lo que sugiere que los mecanismos moleculares que sostienen su homeostasis redox son clave para la resistencia a la fagocitosis.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forma continuamente por la autooxidación de las enzimas redox en las células aeróbicas, y también ingresa desde el medio ambiente, donde puede generarse tanto por procesos químicos como por las acciones deliberadas de organismos competidores. Debido a que el H_2O_2 es sumamente tóxico, las bacterias elaboran enzimas depuradoras para mantener su concentración intracelular en niveles nanomolares.

Recientemente, un análisis de la secuencia del genoma de *R. equi* reveló la presencia de cuatro genes de catalasa potenciales, $\Delta katA$, $\Delta katB$, $\Delta katC$ y $\Delta katD$ donde se construyeron mutantes deficientes en para estudiar la capacidad de sobrevivencia de *R. equi* a la exposición de H_2O_2 in vitro y dentro de macrófagos peritoneales de ratón. En esta investigación se destacó que *KatA*, es el principal determinante de la resistencia a la exposición exógena de H_2O_2 en la fase estacionaria y en menor medida, en la fase exponencial. Además, es crucial para la supervivencia de *R. equi* en macrófagos peritoneales de ratón. De las tres catalasas restantes de *R. equi*, solo *KatC* juega un papel en la resistencia a la exposición externa al H_2O_2 , pero solo en la fase exponencial (Bidaud P y cols., 2012).

En la naturaleza, hay tres familias de catalasas con diferentes características de secuencia de proteínas y dependencias de cofactores, incluidas las catalasas típicas monofuncionales que contienen hemo, las catalasas-peroxidasas bifuncionales que contienen hemo y las catalasas que contienen manganeso (catalasas de Mn) (Johnson LA y cols., 2019). Las catalasas típicas catalizan la dismutación de H_2O_2 a través de un mecanismo de dos etapas. En la primera etapa, el hierro hemo en el centro activo es oxidado por una molécula de H_2O_2 para formar el radical catión π de oxoferil porfirina intermedio ($^{+}Por-Fe(IV) = O$, compuesto I), junto con la producción de agua (Reacción 1). En la segunda etapa, el compuesto I se reduce rápidamente a la forma de porfirina ferrosa por H_2O_2 , con la formación de oxígeno molecular y agua (Reacción 2). Sin embargo, el mecanismo detallado de la reducción de dos electrones del compuesto I por H_2O_2 aún no estaba muy claro (Alfonso-Prieto y cols., 2012).

En este estudio se demostró que *R. equi* posee dos catalasas constitutivas en condiciones aerobias y que la isoforma de tamaño mediano presenta la mayor actividad a muy altas concentraciones de H_2O_2 . Esta proteína es una catalasa típica monofuncional debido a que fue inhibida por la presencia de cianuro, azida y 3-aminotriazol. Mientras que la catalasa de alto peso presenta una actividad baja (Figura 3). Estos resultados están en concordancia con la literatura ya que es común que múltiples catalasas estén codificadas en una bacteria (Klotz y Loewen, 2003) y se ha demostrado que se comportan de manera diferente en respuesta al estrés oxidativo en algunos estudios (Zamocky y cols., 2008). Por ejemplo, la interrupción de *catB* (que codifica una catalasa típica) en *Streptomyces coelicolor* causó un deterioro en la formación de micelio aéreo y la resistencia contra el estrés osmótico, y curiosamente condujo a la producción reducida de undecilprodigiosina y la hiperproducción de actinorrodina (Cho y cols., 2000). Por el contrario, la ruptura de *catA* (que codifica una catalasa típica) no mostró ningún efecto observado sobre la esporulación de *S. coelicolor*, pero redujo significativamente su tolerancia al estrés por H_2O_2 (Cho et al., 2000). Estos estudios destacan las importantes funciones fisiológicas de las catalasas en las bacterias y por tanto, en *R. equi* se deben realizar más estudios para conocer las diversas funciones donde participan las diferentes catalasas.

CONCLUSION

Los resultados mostraron que *Rhodococcus equi* multirresistente presenta dos catalasas constitutivas que son sensibles a los inhibidores clásicos de hemoproteínas (cianuro y azida) y al inhibidor específico (3-amino-triazol). Además, los extractos de hoja de *Moringa oleífera* poseen moléculas que inhiben de esta enzima y demuestran la propiedad antibacteriana de esta planta contra bacterias multirresistentes.

REFERENCIAS

- Alfonso-Prieto M, Vidossich P, Rovira C. The reaction mechanisms of heme catalases: an atomistic view by ab initio molecular dynamics. Arch Biochem Biophys. 2012 Sep 15;525(2):121-30. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.004. Epub 2012 Apr 10. PMID: 22516655.
- Anastasi, E., MacArthur, I., Scotti, M., Alvarez, S., Giguere, S., & Vázquez-Boland, J. A. (2016). Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*. *Genome biology and evolution*, 8(10), 3140-3148.
- Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem. 1952 Mar;195(1):133-40. PMID: 14938361.
- Benoit, S., Benachour, A., Taouji, S., Auffray, Y., & Hartke, A. (2002). H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. *Infection and immunity*, 70(7), 3768-3776.
- Bidaud P, Hébert L, Barbey C, Appourchaux A-C, Torelli R, Sanguinetti M, et al. (2012) *Rhodococcus equi*'s Extreme Resistance to Hydrogen Peroxide Is Mainly Conferred by One of Its Four Catalase Genes. PLoS ONE 7(8): e42396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042396>
- CasoLuengo, R., Coulson, G. B., Miranda-CasoLuengo, A., Vázquez-Boland, J. A., Hondalus, M. K., & Meijer, W. G. (2012). The hydroxamate siderophore rhequichelin is required for virulence of the pathogenic actinomycete *Rhodococcus equi*. *Infection and immunity*, 80(12), 4106-4114.
-
-
-
- Chandramani-Shivalingappa, P., Bhandari, M., Wiechert, S. A., Gilbertie, J., Jones, D. E., & Sponseller, B. A. (2017). Induction of reactive intermediates and autophagy-related proteins upon infection of macrophages with *Rhodococcus equi*. *Scientifica*, 2017.
- Cho, Y. H., Lee, E. J., & Roe, J. H. (2000). A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 35(1), 150-160.
- Darrah, P. A., Hondalus, M. K., Chen, Q., Ischiropoulos, H., & Mosser, D. M. (2000). Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. *Infection and immunity*, 68(6), 3587-3593.
- Dzotam JK, Touani FK, Kuete V. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. BMC Complement Altern Med. 2016 Jan 11;16:9. doi: 10.1186/s12906-016-0990-7. PMID: 26753836; PMCID: PMC4709887.
- Giguère, S., Berghaus, L. J., & Willingham-Lane, J. M. (2017). Antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. *Microbiology spectrum*, 5(5), 5-5.
- Haas A. Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. Cell Microbiol. 2019 Jan;21(1):e12958. doi: 10.1111/cmi.12958. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30251327.
- Huber L, Giguère S, Cohen ND, Slovis NM, Berghaus L, Greiter M, Hart KA. Identification of macrolide- and rifampicin-resistant *Rhodococcus equi* in environmental samples from equine breeding farms in central Kentucky during 2018. Vet Microbiol. 2019 May;232:74-78. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.04.008. Epub 2019 Apr 6. Erratum in: Vet Microbiol. 2020 Jan;240:108530. PMID: 31030848.
- Johnson LA, Hug LA. Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. Free Radic Biol Med. 2019 Aug 20;140:93-102. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.032. Epub 2019 Mar 29. PMID: 30930298.
-
-
-







- Klotz MG, Loewen PC. The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol.* 2003 Jul;20(7):1098-112. doi: 10.1093/molbev/msg129. Epub 2003 May 30. PMID: 12777528.
- Labella A, Gennari M, Ghidini V, Trento I, Manfrin A, Borrego JJ, Lleo MM. High incidence of antibiotic multi-resistant bacteria in coastal areas dedicated to fish farming. *Mar Pollut Bull.* 2013 May 15;70(1-2):197-203. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.02.037. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23518445.
- Letek M, Ocampo-Sosa AA, Sanders M, Fogarty U, Buckley T, Leadon DP, González P, Scotti M, Meijer WG, Parkhill J, Bentley S, Vázquez-Boland JA. Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host-associated vapA and vapB virulence plasmids. *J Bacteriol.* 2008 Sep;190(17):5797-805. doi: 10.1128/JB.00468-08. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18606735; PMCID: PMC2519538.
- Letek M, González P, Macarthur I, Rodríguez H, Freeman TC, Valero-Rello A, Blanco M, Buckley T, Cherevach I, Fahey R, Hapeshi A, Holdstock J, Leadon D, Navas J, Ocampo A, Quail MA, Sanders M, Scotti MM, Prescott JF, Fogarty U, Meijer WG, Parkhill J, Bentley SD, Vázquez-Boland JA. The genome of a pathogenic rhodococcus: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genet.* 2010 Sep 30;6(9):e1001145. doi: 10.1371/journal.pgen.1001145. PMID: 20941392; PMCID: PMC2947987.
- Miranda-CasoLuengo, R., Coulson, G. B., Miranda-CasoLuengo, A., Vázquez-Boland, J. A., Hondalus, M. K., & Meijer, W. G. (2012). The hydroxamate siderophore rhequichelin is required for virulence of the pathogenic actinomycete *Rhodococcus equi*. *Infection and immunity*, 80(12), 4106-4114.
- Muscatello, G., Anderson, G. A., Gilkerson, J. R., & Browning, G. F. (2006). Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6152-6160.
- Opara, A. U., Anyanwu, G., & Uloneme, G. C. (2015). The antibacterial action of *Moringa oleifera* on some wound and enteric pathogens. *J. Med. Sci. Clin. Res*, 3(7), 6741-6757.
- Pezzoni M, Tribelli PM, Pizarro RA, López NI, Costa CS. Exposure to low UVA doses increases KatA and KatB catalase activities, and confers cross-protection against subsequent oxidative injuries in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*. 2016 May;162(5):855-864. doi: 10.1099/mic.0.000268. Epub 2016 Mar 3. PMID: 26940049.
- Rahman MT, Herron LL, Kapur V, Meijer WG, Byrne BA, Ren J, Nicholson VM, Prescott JF. Partial genome sequencing of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet Microbiol.* 2003 Jul 1;94(2):143-58. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00100-7. PMID: 12781482.
- Ramey AM, Ahlstrom CA. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *J Wildl Dis.* 2020 Jan;56(1):1-15. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31567035.
- Tuon, F. F., Siciliano, R. F., Al-Musawi, T., Rossi, F., Capelozzi, V. L., Gryscek, R. C., & Medeiros, E. A. S. (2007). *Rhodococcus equi* bacteremia with lung abscess misdiagnosed as *Corynebacterium*: a report of 2 cases. *Clinics*, 62(6), 795-798.
- Vázquez-Boland JA, Meijer WG. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what's in a name? *Mol Microbiol.* 2019 Jul;112(1):1-15. doi: 10.1111/mmi.14267. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31099908; PMCID: PMC6852188.
- Valdez-Solana, M. A., Mejia-Garcia, V. Y., Tellez-Valencia, A., Garcia-Arenas, G., Salas-Pacheco, J., Alba-Romero, J. J., & Sierra-Campos, E. (2015). Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of *Moringa oleifera* grown in Mexico. *Journal of Chemistry*, 2015.
- Valero-Rello A, Hapeshi A, Anastasi E, Alvarez S, Scotti M, Meijer WG, MacArthur I, Vázquez-Boland JA. An Invertron-Like Linear Plasmid Mediates Intracellular Survival and Virulence in Bovine Isolates of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun.* 2015 Jul;83(7):2725-37. doi: 10.1128/IAI.00376-15. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25895973; PMCID: PMC4468562.
- Van der Geize, R., Grommen, A. W. F., Hessels, G. I., Jacobs, A. A. C., & Dijkhuizen, L. (2011). The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development. *PLoS pathogens*, 7(8), e1002181.
-

- von Bargaen K, Scraba M, Krämer I, Ketterer M, Nehls C, Krokowski S, Repnik U, Wittlich M, Maaser A, Zapka P, Bunge M, Schlesinger M, Huth G, Klees A, Hansen P, Jeschke A, Bendas G, Utermöhlen O, Griffiths G, Gutschmann T, Wohlmann J,
- Zámocký M, Gasselhuber B, Furtmüller PG, Obinger C. Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. Arch Biochem Biophys. 2012 Sep 15;525(2):131-44. doi: 10.1016/j.abb.2012.01.017. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22330759; PMCID: PMC3523812.

Cuerpo académico UJED-GD-0030

LGAC: Educación Ambiental y Biotecnología Ambiental

En desarrollo

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Producción de compuestos de valor agregado a partir de residuos agropecuarios	M.C. Aurelio Maldonado Cabrera	
Aislamiento, selección e identificación de agentes microbianos con potencial de aplicación biotecnológico	M.C. Romana Ramírez Flores	
Selección de cepas nativas de hongos, con capacidad de sacarificación del estiércol bovino lechero como sustrato de celulosa	M.C. Saulo Zuñiga Sosa	
Monitoreo de <i>Salmonella spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> de rastros TIF de la Comarca Lagunera	M.C. Saulo Zuñiga Sosa	
Bioeconomía regional de microalgas para el tratamiento de aguas residuales	Dr. Jesús Vásquez Arroyo	
Microbioma: Salud ambiental, animal y humana	Dr. Jesús Vásquez Arroyo	

Detección *in silico* del integrón clase IV en *Aeromonas caviae*

In silico detection of class IV integron in *Aeromonas caviae*

¹Pelcastre-Rodríguez Leda Ivonne, ¹Morales-Luna Lucia, ¹Hernández-Cortez Cecilia, ¹Colmenero-Solís Raúl de Jesús, ³Arzate-Barbosa Patricia, ¹Castro-Escarpulli Graciela.

¹ Laboratorio de Investigación Clínica y Ambiental, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Colonia Plutarco Elías Calles, Delegación Miguel Hidalgo, Código Postal 11340 Ciudad de México

² Laboratorio de Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

³ Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México.

*Email: chelacastro@hotmail.com

RESUMEN

Los integrones se clasifican en integrones móviles e integrones cromosomales, estos sistemas constan de tres componentes fundamentales: una integrasa que media la integración y escisión de los casetes, un sitio de recombinación attI, y un sitio promotor Pc. Siendo los integrones clase I los más ampliamente distribuidos. Los integrones tienen la capacidad de transportar casetes con diferentes funciones y son compatibles con la adquisición de genes de resistencia. El objetivo de este trabajo es ensamblar, evaluar y anotar cinco genomas de cepas de *Aeromonas caviae* de origen clínico.

Se descargaron las secuencias de la plataforma Illumina NextSeq 500 de cinco cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría. Las secuencias fueron sometidas a un análisis de control de calidad con el programa FastQC. Posteriormente se concatenaron los archivos para obtener los ensamblados con el programa SPAdes, consecutivamente estos se analizaron con el servidor QUAST y se compararon los ensamblados con la cepa de referencia *Aeromonas caviae* FDAARGOS_72 mediante alineamientos múltiples con el programa Mauve. Los archivos obtenidos se anotaron con los servidores RAST y Prokka. El análisis de las secuencias demostró una buena calidad de la secuenciación para todas las lecturas. Los alineamientos múltiples determinaron la presencia de varios genes que se encuentran en posiciones diferentes, algunos de ellos se encuentran en la cadena complementaria y la anotación de los genomas demostró genes codificantes para conjugación y transposición, factores putativos de virulencia, además en la cepa C-16-10-13 se detectaron dos integrasas, una de ellas perteneciente al integrón

de clase I, la segunda se corroboró con la secuencia de aminoácidos en los servidores BLAST y UniProt obteniendo que pertenece a la familia TIGR02249 la cual comprende integrasas asociadas al integrón de clase IV. En conclusión, en el genoma de *Aeromonas caviae* ensamblado y anotado se demostró por primera vez la presencia de un integrón de clase IV.

Palabras clave: Integrón, *Aeromonas*, Conjugación, Ensamblado.

ABSTRACT

Integrons are classified into mobile integrons and chromosomal integrons, these systems consist of three fundamental components: an integrase that mediates the integration and cleavage of the cassettes, an attI recombination site, and a Pc promoter site. Class I integrons being the most widely distributed. Integrons have the ability to carry cassettes with different functions and are compatible with the acquisition of resistance genes. The objective of this work is to assemble, evaluate and annotate five genomes of *Aeromonas caviae* strains of clinical origin.

Sequences of five *Aeromonas* strains isolated from pediatric patients were downloaded from the Illumina NextSeq 500 platform from the National Institute of Pediatrics. The sequences were subjected to a quality control analysis with the FastQC program. Subsequently, the files were concatenated to obtain the assemblies with the SPAdes program, these were consecutively analyzed with the QUAST server and the assemblies were compared with the reference strain *Aeromonas caviae* FDAARGOS_72 by means of multiple alignments with

the Mauve program. The files obtained were annotated with the RAST and Prokka servers. Sequence analysis demonstrated good sequencing quality for all reads. The multiple alignments determined the presence of several genes that are in different positions, some of them are in the complementary chain and the annotation of the genomes showed coding genes for conjugation and transposition, putative virulence factors, also in the C- strain. 16-10-13 two integrases were detected, one of them belonging to the class I integron, the second was corroborated with the amino acid sequence in the BLAST and UniProt servers, obtaining that it belongs to the TIGR02249 family which comprises integrases associated with the integron of class IV. In conclusion, in the assembled and annotated *Aeromonas caviae* genome the presence of a class IV integron was demonstrated for the first time.

Keywords: Integron, *Aeromonas*, Conjugation, Assembled.

INTRODUCCIÓN

Los integrones son sistemas naturales de clonación y expresión capaces de incorporar marcos abiertos de lectura mediante una combinación específica de sitio y convertirlos en genes funcionales (Wang, *et al.*, 2017). Lo integrones constan de tres componentes fundamentales: un gen *intI* que codifica para una integrasa que media la integración y escisión de los casetes mediante recombinación sitio específica, también posee un sitio de recombinación *attI*, y un sitio promotor *P_c*, otros de sus componentes son: el gen *qacE* deletado, codificante de una proteína de bombeo que confiere resistencia a compuestos cuaternarios de amonio y el gen *sull*, codificante de una proteína que confiere resistencia a sulfonamida (Deng, *et al.*, 2015). Los integrones se pueden clasificar en 2 grupos según su ubicación: integrones móviles e integrones cromosomales. Estos dos grupos presentan características que marcan historias evolutivas diferentes. Estudios evolutivos indican que los integrones son estructuras antiguas y que los integrones cromosomales dieron origen a los integrones móviles. Se han descrito cinco diferentes tipos de integrones móviles; clase I, II, III, IV y V esta clasificación está basada en la secuencia del gen de la integrasa, basados en la secuencia del gen de la integrasa, de los cuales se sabe que los integrones de clase 1 son los que se detectan con mayor frecuencia en cepas de origen clínico y están fuertemente asociados con resistencia a múltiples antibióticos (Yu, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2017).

El integrón clase IV fue descrito por primera vez en *Vibrio cholerae* y se describe que contiene al menos 178 casetes de genes (Akrami, F. *et al.*, 2019). Este integrón se ha reportado principalmente en los grupos *Vibrionaceae*, *Xanthomonas* y *Pseudomonadaceae*. Hasta la fecha, se ha descubierto que los integrones de clase IV llevan casetes de genes que imparten resistencia a la fosfomicina y al cloranfenicol (Gillings, *et al.*, 2014). Se dice que los casetes de genes en los integrones son uno de los componentes compatibles de las bacterias con el medio ambiente. Los integrones tienen la capacidad de transportar casetes con una variedad de funciones y también son compatibles con la adquisición y expresión de componentes de resistencia. Por lo que este trabajo tiene como objetivo el ensamblar, evaluar y anotar cinco genomas de cepas de *Aeromonas caviae* de origen clínico, con la finalidad de determinar diferentes factores putativos de virulencia y elementos genéticos móviles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se descargaron cinco genomas secuenciados de la interfaz del BaseSpace de cepas de *Aeromonas caviae* aisladas de pacientes que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría, dichas cepas se secuenciaron en el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria (SENASICA) con la plataforma Illumina Next Seq 500.

Análisis de calidad de las secuencias

Las secuencias descargadas de la plataforma Illumina NextSeq 500 fueron sometidas a un análisis de control de calidad con el programa FastQC versión 0.11.8. Los archivos previamente fueron sometidos a un tratamiento con el programa Trimmomatic usando los parámetros SLIDINGWINDOW: 4:15 y MINLEN:70, en donde SLIDINGWINDOW está dado por: windowSize (especifica el número de bases) y requiredQuality (especifica la calidad requerida). Por su parte MINLEN elimina la lectura si está por debajo de una longitud específica.

Posteriormente las lecturas que recibieron el tratamiento se analizaron con el programa FastQC para determinar la calidad en las secuencias. Una vez realizado esto, se concatenaron los archivos con la finalidad de obtener dos lecturas para cada genoma estudiado, uno correspondiente a la secuencia líder y otro que corresponde a la secuencia complementaria. Posterior

a esto se seleccionó el programa SPAdes para realizar el ensamblado, cada ensamblado se cargó en el servidor QUAST en la opción *Assembly*, para evaluar la calidad de cada ensamblado (Bankevich, *et al.*, 2012; Gurevich, *et al.*, 2013).

Alineamientos múltiples con el programa MAUVE

Los ensamblados de los cinco genomas de *Aeromonas caviae* fueron comparadas con la cepa tipo *Aeromonas caviae* FDAARGOS_72, cuyo genoma se encuentra completo y fue aislado de un paciente pediátrico. Los archivos resultantes para cada cepa se concatenaron para obtener una sola lectura.

Anotación de los ensamblados con los servidores RAST y Prokka

La anotación en el servidor RAST se realizó desde la dirección <http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>; después desde la opción upload a new job se cargaron los archivos previamente alineados y concatenados, se utilizaron los parámetros para la anotación clásica preestablecidos en el servidor (Aziz, *et al.* 2008).

Para la anotación con Prokka 1.11.0, se realizó desde la consola, con los mismos archivos alineados y concatenados utilizados en la anotación con RAST, para

la visualización de los resultados de este alineamiento se construyó un diagrama de Venn en el programa Ortho Venn 2.0; el cual, a través de la comparación de las secuencias proteicas de los genomas anotados, integra cuáles se comparten y cuáles no. Los resultados de ambas anotaciones permiten la detección de factores putativos de virulencia, ordenados en subcategorías en el caso de la anotación con RAST o a través de la búsqueda de proteínas con el servidor UniProt en <https://www.uniprot.org/> para la anotación con Prokka (Seemann, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio *in silico* de genomas bacterianos permite obtener una gran cantidad de información como la distribución de genes y para qué codifican, dicha información es útil para conocer el comportamiento de los microorganismos (Singh, 2016). En el presente trabajo se analizaron secuencias de cinco cepas aisladas de pacientes pediátricos las cuales fueron identificadas como *Aeromonas caviae*, en México el aislamiento de esta especie se ha reportado aproximadamente entre el 30 y 40 % de los aislados causando infecciones gastrointestinales, sistémicas o incluso de piel y tejidos blandos (Castro-Escarpulli, *et al.*, 2002; Aguilar-García, 2015).

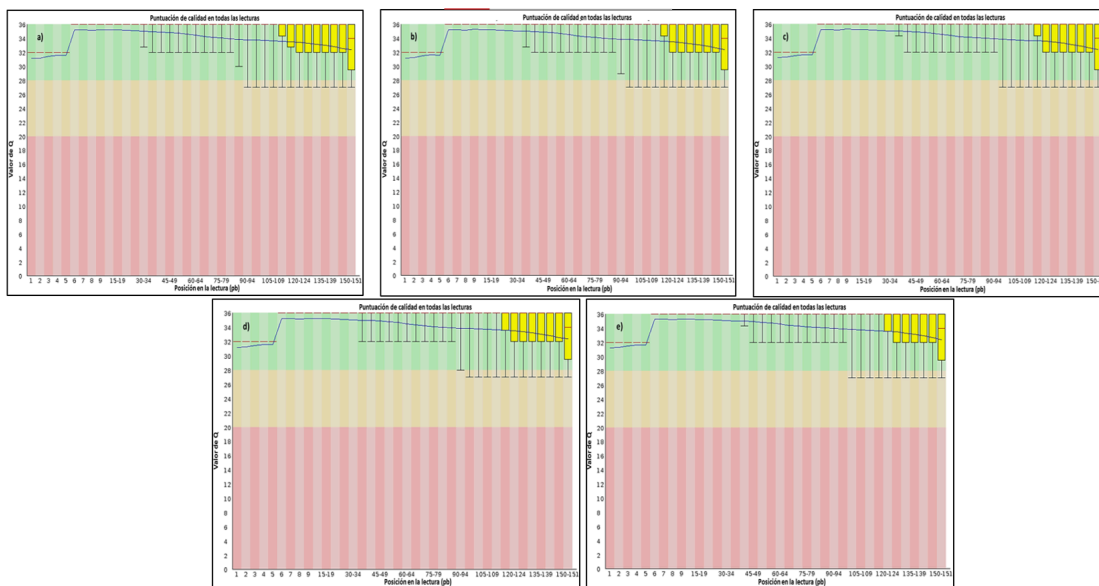


Figura 1. Distribución de calidad de las cinco secuencias tratadas con Trimmomatic; C-112-09-13 (a), C-16-10-13 (b), H-322-03-14 (c), H-373-08-15 (d) y C-25-12-15 (e). La calidad está dada por el valor Q o calidad de Phred (eje de las ordenadas), en las cinco cepas se obtuvo un valor medio de Q (línea azul) de 34, así mismo el gráfico se encuentra dividido en tres partes con diferentes colores, donde el color verde indica una buena calidad, el color naranja una calidad medianamente aceptable y en rojo una mala calidad, en color amarillo se observan las barras de error de las secuencias de baja calidad.

Para este estudio es importante que los archivos de secuenciación se les determine el valor de calidad de Phred es decir la probabilidad que el secuenciador haya asignado la base nucleotídica correcta, ya que a pesar de que la secuenciación con Illumina tiene una exactitud de lectura del 99.9 % existe la posibilidad de errores durante el proceso. Para la determinación de esta calidad se hace uso del programa FastQC además de determinar dicha calidad indica otros parámetros como el contenido de GC, la presencia de secuencias repetidas y la presencia de N que son nucleótidos que el secuenciador no pudo determinar y se le asignó la letra N (Hernández *et al.*, 2019).

Los parámetros de las secuencias cumplieron con un porcentaje de GC del 61 % además que no existía evidencia de nucleótidos N, no obstante, el valor de Q o Phred no cumplió con la condición esperada para las últimas lecturas de secuenciación en todos los genomas de las secuencias en crudo, este error en algunas ocasiones refiere a que el secuenciador introdujo bases que no correspondían al genoma y de esta manera la calidad baja (Kchouk *et al.*, 2017).

Para mejorar la calidad de las secuencias se sometieron a un tratamiento con el programa Trimmomatic. Bolger y colaboradores en 2014 señalaron el uso de Trimmomatic como la herramienta más útil para llevar a cabo el filtrado de calidad, ya que los resultados en su estudio indicaron una mayor eficiencia para la lectura y recorte de secuencias de baja calidad en comparación con otros programas de filtrado, además observaron que el uso de este programa optimiza el ensamble de genomas utilizando el método de novo en un 40 y 50 % más.

Los archivos generados después del recorte con los parámetros establecidos eliminaron aproximadamente 11 % de bases, que correspondían a lecturas erróneas durante el proceso de secuenciación para las cinco cepas, después se efectuó un análisis de calidad de las lecturas recortadas, se obtuvo un valor medio de Q o calidad de Phred por arriba de 34 (figura 1).

Para el ensamblado se utilizó el programa SPAdes, esta herramienta mejora los ensambladores anteriores para obtener menor cantidad de fragmentos (contigs), lo cual aumenta la posibilidad de tener genomas más completos (Bankevich *et al.*, 2012). Los cinco genomas ensamblados se sometieron a un análisis de calidad con QUAST, determinando que los genomas con base a su valor estadístico de N50 entran en el rango de buena

calidad debido a que los genomas no se encuentran tan fragmentados o presentan una menor cantidad de *contigs*.

Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con el programa Mauve de los genomas con la cepa tipo *Aeromonas caviae* FDAARGOS_72, cuyo objetivo fue reacomodar las secuencias ensambladas con base en esta, así como determinar las diferencias entre el genoma de la cepa tipo y el genoma de las cepas alineadas (Figura 2). Los bloques del mismo color conectados por líneas indican en qué región del genoma se encuentran genes homólogos llamados bloques locales colineales (LCBs), en estos esquemas la región de secuencia cubierta por un bloque de color es completamente colineal y homóloga entre los genomas comparados.

Los límites de los bloques de colores marcados por una línea roja suelen indicar los puntos de ruptura del reordenamiento del genoma. Dentro de cada bloque, Mauve realiza un perfil de similitud de la secuencia del genoma. La altura del perfil de similitud corresponde al nivel medio de conservación en esa región de la secuencia del genoma y las áreas que son completamente blancas son aquellas regiones que no se alinearon y probablemente contienen elementos de secuencia específicos de un genoma en particular.

La cantidad de LCBs para la cepa C-112-09-13 es de 15 (Figura 2a), de las cuales cinco están invertidas en el genoma, para la cepa C-16-10-13 los LCBs son 16, y de estos, 13 LCBs aparecen en la misma ubicación de ambos genomas (Figura 2b). Los LCBs en la cepa H-322-03-14 son 32, al igual que en la cepa H-737-08-15 (Figura 2c). En el alineamiento de la cepa tipo con la cepa H-373-08-15 se observan también, bloques de secuencias que pasaron de la cadena directa a la cadena complementaria (Figura 2d). Finalmente, en la cepa C-25-12-15, existen un total de 30 LCBs (Figura 2e). A pesar de las diferencias entre la cantidad de LCBs de los cinco genomas, se puede observar que en los cinco alineamientos existe una región homóloga aproximadamente en la posición 4 000 000. Siendo esta una región sinténica altamente conservada entre los genomas comparados. En el 2004 Rocha explica que el dinamismo que existe en los genomas se debe a la interacción del microorganismo con el medio ambiente. También los cambios de posición que existen se deben a secuencias de inserción, eventos de recombinación o delección de genes por la acumulación de mutaciones puntuales en el genoma. Por esto, existen regiones sinténicas, en los alineamientos realizados en

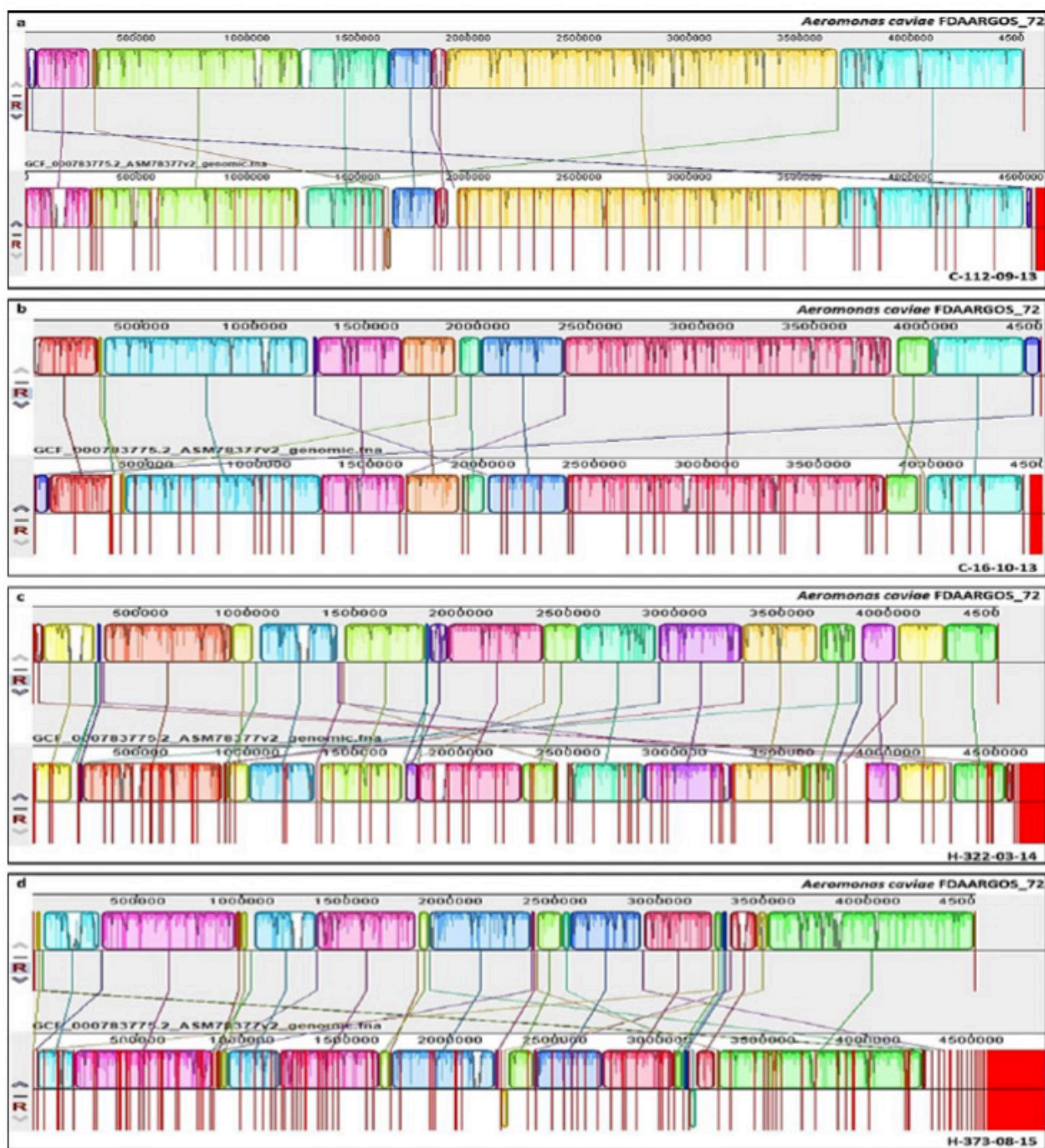


Figura 2. Rearreglos genómicos de las cinco cepas con Mauve. C-112-09-13 (a), C-16-10-13 (b), H-322-03-14 (c), H-373-08-15 (d) y C-25-12-15 (e). Las regiones sinténicas o LCBs se muestran en bloques de diferentes colores, en algunos de estos bloques se observa que el orden de las secuencias de las cepas de trabajo es diferente al de la cepa tipo; y los bloques en la parte inferior indican un cambio de esos genes de la cadena líder a la cadena complementaria.

el presente trabajo, sin embargo, la mayoría de los LCBs se encuentran en una región distinta del genoma, ya que la expresión de esa secuencia puede o no ser de mayor requerimiento para el microorganismo, y en aquellas secuencias en las cuales no existen cambios en la posición de alineamiento su funcionalidad se mantiene en esa región, y no existe la necesidad de algún cambio.

Por otro lado, Darling y colaboradores en el 2004 realizaron un estudio con el alineamiento de genomas de *Escherichia coli* y a pesar de ser genomas del mismo género y especie detectaron que existían múltiples reordenamientos en los genomas debido a eventos tales como transferencia horizontal de genes o secuencias de inserción, por lo tanto, el uso de este programa es importante cuando se estudian genomas secuenciados ya que Mauve es capaz de alinear regiones conservadas entre dos organismos aún en presencia de eventos de reordenamiento en los genomas comparados.

La anotación con dos diferentes herramientas aporta una mayor cantidad de información, con RAST se detectó una gran cantidad de subsistemas compartidos entre las cinco cepas de *Aeromonas* tales como sistemas de secreción tipo II y IV, sideróforos, DNAsas, resistencia a fluoroquinolonas y fosfomicina, así como, la presencia de bombas de eflujo clasificadas en el subsistema de virulencia dentro de la subcategoría de resistencia a antimicrobianos (Figura 3), en la cepa C-112-09-13 además se observa la presencia del sistema de secreción tipo 0, (Figura 3a). Se detectó en la cepa C-16-10-13 dos integrasas una de ellas correspondiente a un integrón de clase I y la otra integrasa que pertenece a un integrón de clase IV, ambos elementos móviles (Figura 3b).

De manera visual en el servidor RAST al dividir la anotación en subsistemas se pueden demostrar fácilmente algunas funciones importantes dentro del genoma; para las cinco secuencias el hallazgo de factores putativos de virulencia del género *Aeromonas* hace referencia a que su presencia en conjunto se puede considerar como factor de riesgo en los infantes debido a que los sistemas de secreción transportan moléculas tales como toxinas desde el citoplasma de la bacteria hacia el exterior o a la célula blanco, las enterotoxinas Alt y Ast incrementan las prostaglandinas y el AMPc en la mucosa intestinal, por su parte, el sideróforo actúa como un agente quelante de hierro en las células del hospedero y por último las DNAsas participan en la invasión celular además de contribuir a proporcionarle a la bacteria una fuente de carbono y nitrógeno por la

degradación de ácidos nucleicos, la aerolisina un tipo de hemolisina secretada por el sistema de secreción tipo II la cual se une a la glicoproteína de la membrana de los eritrocitos causando su lisis; en el género se han definido dos tipos de hemolisinas, la α y la β (Fernández-Bravo, *et al.*, 2020).

A partir de la secuencia de aminoácidos que codifica para la integrasa de clase IV, se utilizó la plataforma BLAST disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> con la finalidad de saber si dicha integrasa pertenece realmente a un integrón, el alineamiento detectó que dicha secuencia pertenece a una familia de integrasas con el número TIGR02249 la cual comprende integrasas asociadas a integrones entre ellos el integrón de clase IV, además, se utilizó el servidor UniProt y se obtuvo que para esa secuencia de aminoácidos tres cepas de *Aeromonas* spp., tienen un gen para un integrón con una identidad del 77 %, sin embargo, no se menciona cuál es la clase de integrón que poseen dichas cepas.

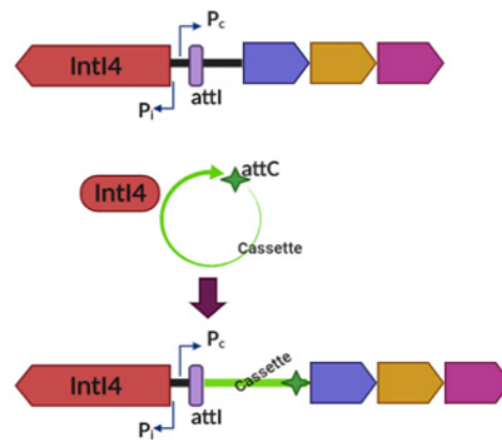


Figura 4. Representación de la estructura de un integrón de clase IV. Este está compuesto por la integrasa, el promotor de esta y el promotor que dirige la transcripción de los casetes integrados, un sitio llamado attI que es el sitio de recombinación del integrón en donde son introducidos los nuevos casetes y por último un sitio attC, este se encuentra en el cassette nuevo a introducir y es reconocido por la integrasa.

Por otro lado, se determinó también un gen de *Plesiomonas shigelloides* 302-73, para un integrón de clase IV con una identidad del 69.5 %, con base en estos resultados se diseñó una representación gráfica del integrón clase IV, la estructura básica está compuesta por la integrasa, los promotores, los sitios de recombinación y los casetes genéticos, debido a que no se tiene un estudio detallado del hallazgo de este integrón en la cepa C-16-10-13 no es

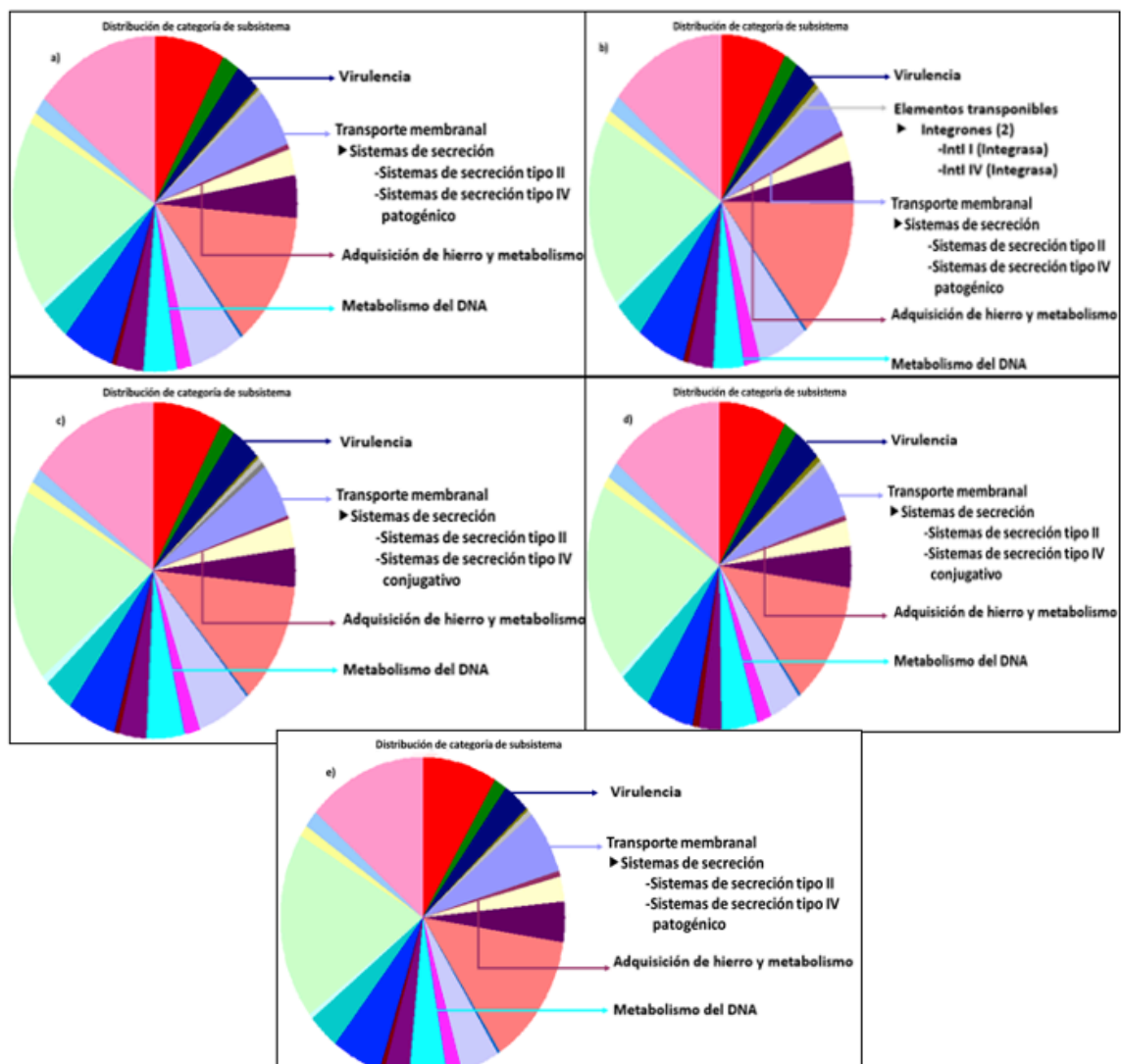


Figura 3. Anotación de las secuencias con RAST. C-112-09-13 (a), C-16-10-13 (b), H-322-03-14 (c), H-373-08-15 (d) y C-25-12-15 (e). El subsistema de virulencia muestra la presencia de bombas de eflujo para conferirle multidrogo resistencia a los cinco genomas, así como la resistencia a antimicrobianos tales como fluoroquinolonas y fosfomicina. El subsistema llamado transporte transmembranal hace referencia a los sistemas de secreción tipo II y IV presentes en los cinco genomas. En la descripción del subsistema llamado adquisición de hierro y metabolismo se detectaron los sideróforos y en el subsistema llamado metabolismos del DNA, la presencia de DNAsas. La flecha gris señala las integrasas de los integrones clase I y IV detectados dentro del subsistema de elementos transponibles en el genoma de la cepa C-16-10-13.

la detección de proteínas codificantes para transferencia horizontal de genes acción que el género *Aeromonas* lleva a cabo sobre todo para la adquisición de genes que le confieren resistencia a antimicrobianos (Bello-López *et al.*, 2019) por lo tanto, cabe la posibilidad que las cepas sean resistentes a dichos antimicrobianos debido a la transferencia horizontal de genes (Ruppé *et al.*, 2018).

La anotación con dos diferentes herramientas aporta una mayor cantidad de información, ya que con los archivos del proteoma de las secuencias ensambladas con el programa Prokka y el diagrama de Venn se visualizaron las diferencias y similitudes de estas por lo cual los factores de virulencia detectados en las secuencias podrían participar en el mecanismo de patogenicidad, del género *Aeromonas* ya que este no se encuentra descrito en su totalidad (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002).

CONCLUSIÓN

En el genoma de *Aeromonas caviae* ensamblado y anotado se detectaron genes codificantes para conjugación y transposición, factores putativos de virulencia, así como de un integrón de clase I. Se demostró por primera vez la presencia de un integrón clase IV en una cepa del género *Aeromonas*.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS

Los autores declaran no existen conflictos de intereses

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo formó parte de Proyecto Sistema CRISPR-Cas una nueva alternativa de identificación bacteriana (SIP 2021351) apoyado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Graciela Castro- Escarpulli recibe becas de Estímulos al Desempeño de los Investigadores Investigación, Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (Instituto Politécnico Nacional), Cecilia Hernández-Cortez y Graciela Castro- Escarpulli reciben beca del Sistema Nacional de Investigadores (SNI, CONACyT).

REFERENCIAS

- Aguilar-García C. Infección de piel y tejidos blandos por el género *Aeromonas*. *Medicina Interna de México* 2015; 31:701-708.
-

- Akrami F, Rajabnia M, Pournajaf A. Resistance integrons; A Mini review. *Caspian journal of internal medicine* 2019; 10 suppl 4: 370-376.
- Aziz R, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards R, Meyer F. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 2008; 9: 75.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 2012; 19 suppl 5: 455-477.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 2012; 19 suppl 5: 455-477.
- Bello-López, J, Cabrero-Martínez O, Ibáñez-Cervantes G, Hernández-Cortez C, Pelcastre-Rodríguez L, Gonzalez-Avila, L, *et al.* Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp. *Microorganisms* 2019; 7 suppl 9: 363.
- Bolger A, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30 suppl 15: 2114-2120.
- Cambray G, Guerout A, Mazel D. Integrons. *Annual Review of Genetics* 2010; 44: 141-166.
- Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola M, Giono S, Hernández-Rodríguez C, Rodríguez C, Soler F. *et al.* El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México?, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2002; 22 suppl 4: 206-216.
- Clark C, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T, Manning, P. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AF025662, AF055586, X64097, AF179593 and AF179596. *Microbiology* 2000; 146 suppl 10: 2605-2612.
- Darling A, Mau B, Blattner F, Perna N. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* 2004; 14: 1394-1403.
-
-

- Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J. *et al.* Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2015; 1:14-45.
- Deng Y, Wu Y, Jiang L, Tan A, Zhang R, Luo L. Multi-Drug Resistance Mediated by Class 1 Integrons in *Aeromonas* Isolated from Farmed Freshwater Animals. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7:935.
- Fernández-Bravo A, Figueras M. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* 2020; 8: 129.
- Fluit, A, Schmitz F. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; 10 suppl 4: 272-288.
- Gillings M. Integrons: past, present, and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2014; 78:257-277.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013; 29 suppl 8: 1072-1075.
- Hernández M, Quijada N, Rodríguez-Lázaro D, Eiros J. Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología* 2019; 52: 150-161.
- Kchouk M, Gibrat J, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Computers in Biology and Medicine* 2017; 9 suppl 3:1-8.
- Pérez-Valdespino A, Lazarini-Martínez A, Rivera-González A, García-Hernández N, Curiel-Quesada E. Dynamics of a Class 1 Integron Located on Plasmid or Chromosome in Two *Aeromonas* spp. Strains. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 1556.
- Rocha E. Order and disorder in bacterial genomes. *Current Opinion in Microbiology* 2004; 7 suppl 5: 519-527.
- Ruppé E, Cherkaoui A, Wagner N, La Scala G, Beaulieu J, Girard M. *et al.* In vivo selection of a multidrug-resistant *Aeromonas salmonicida* during medicinal leech therapy. *New Microbes and New Infections* 2018; 21: 23-27.
- Sarria-Guzmán Y, López-Ramírez M, Chávez-Romero Y, Ruiz-Romero E, Dendooven L, Bello-López J. Identification of antibiotic resistance cassettes in class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.). *Current Microbiology* 2013; 68 suppl 5: 581-586.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; 30 suppl 14: 2068-2069.
- Singh H. Bioinformatics: Benefits to Mankind. *International Journal of PharmTech Research* 2016; 9 suppl 4:242-248.
- Wang D, Hou W, Chen J, Yang L, Liu Z, Yin Z. *et al.* Characterization of Novel Integrons, In1085 and In1086, and the Surrounding Genes in Plasmids from Enterobacteriaceae, and the Role for attCaadA16 Structural Features during attI1 × attC Integration. *Frontiers in Microbiology* 2017; 1:1-9.
- Yu H, Lee J, Kang H, Ro D, Chung J, Jeong Y. *et al.* Changes in Gene Cassettes of Class 1 Integrons among. *Society* 2003; 41:5429-5433.

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PERFIL DE INGRESO

Conocimientos básicos e interés en las áreas de: Química, Física, Matemáticas y Biología.

Ser creativo y observador, capacidad de síntesis y análisis crítico, afinidad y gusto por la investigación y el trabajo en el laboratorio.

Ser responsable, perseverante, propositivo y tener interés por el mejoramiento sociocultural y económico.

PERFIL DE EGRESO

- Controlar, diseñar y analizar procesos fisicoquímicos y biológicos en alimentos
- Desarrollar tecnología propia para el procesamiento, conservación y empaques de alimentos
- Investigación y desarrollo de nuevos productos alimenticios



Cuerpo académico UJE-CA-103 Ciencia y Tecnología de Alimentos

LGAC: Desarrollo e innovación de Alimentos

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Potencial nutracéutico de maíz pigmentado cultivado en la comarca lagunera.	Miguel Aguilera Ortiz	
Caracterización y purificación de la enzima coagulante de la leche presente en la <i>Moringa oleifera</i> y su uso potencial en la elaboración del queso de soya.	Erick Sierra Campos	
Purificación y caracterización bioquímica de las proteasas de la semilla de <i>Moringa oleifera</i> Lam. Y su uso potencial en la producción de péptidos bioactivos por la hidrólisis de la K-caseína y β -conglucina		
Los polifenoles del extracto de <i>Moringa oleifera</i> evitan la disfunción mitocondrial y estimular el estado redox celular en ratas con diabetes tipo II.		
Proteómica y genómica de especies bacterianas y virales aisladas de especies animales		
El extracto de las hojas de <i>Moringa oleifera</i> protege contra la dislipidemia metabólica en ratas diabéticas al regular la paraoxonasa-1 y la oxidonitricosintasa		
Compuestos activos con capacidad hipoglucemiante en <i>Cnidocolus chayamansa</i> (chaya), <i>Euphorbia prostrata</i> (Hierba de la golondrina), y <i>Jathrophia dioica</i> (Sangre de drago).	Juan Ramón Esparza Rivera	
Producción de hortalizas de alta rentabilidad con sustratos y soluciones nutritivas orgánicas bajo invernadero.		
Diseño y uso de cubiertas comestibles a base de polisacáridos para aumentar la vida de anaquel de frutas y hortalizas	Jorge Armando Meza Velázquez	
Aplicación de tecnologías emergentes para la conservación de alimentos		



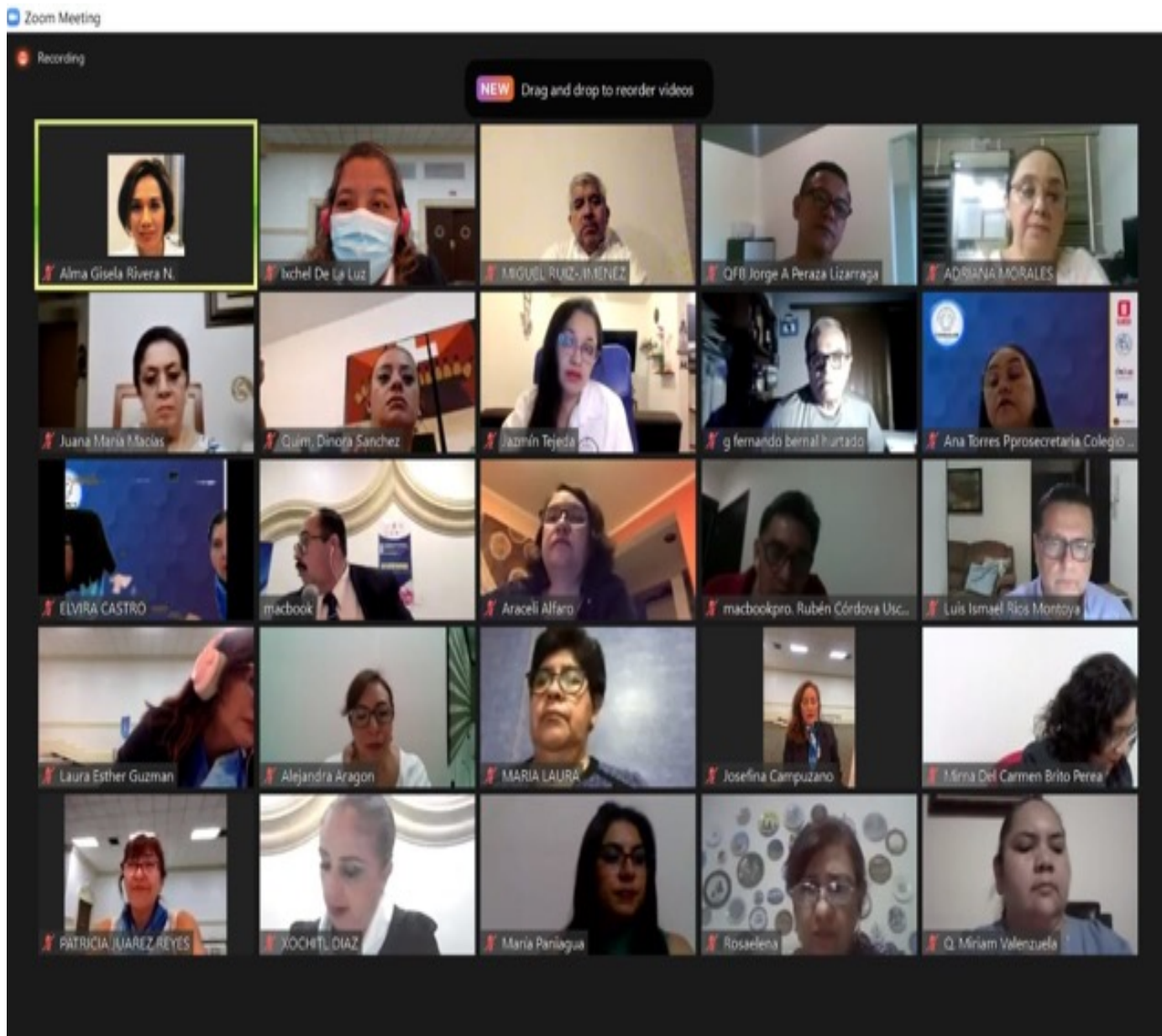
Cuerpo Académico UJE-CA-131 Ciencias Farmacoquímicas de Productos Naturales

LGAC: Farmacoquímica de los Productos Naturales

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Resistencia bacteriana a los antibióticos y búsqueda de serotipos bacterianos de interés clínico	Concepción García Luján	
Productos naturales con propiedades bioactivas en plantas del semidesierto y en productos de la colmena		
Desarrollo de diversos productos a base de cera de candelilla (<i>Euphorbia Antisiphylitica</i>)	Miguel Téllez López	
Aislamiento e identificación de alcaloides presentes en las hojas de <i>Coffea arabica</i>		
Evaluación hipoglucemiante de diversas especies vegetales		Ruth Alanís Bañuelos
Actividad biológica, farmacológica e inhibición enzimática de los géneros <i>Cirsium Silybum</i>	Relevancia de polimorfismos genéticos para las reacciones adversas y la respuesta clínica a fármacos	
Relevancia de polimorfismos genéticos para las reacciones adversas y la respuesta clínica a fármacos	Biofortificación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. con selenio	
Biofortificación de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. con selenio	Ángeles Sáenz Esqueda	
Evaluación fitoquímica, toxicológica e identificación molecular de <i>Ibervillea sonorae</i> Greene		Evaluación del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de mezclas del gel de aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i> Miller) y pasta prensada de uva (<i>Vitis vinifera</i>) obtenidas mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia.

CIENCIAS BIOMÉDICAS

(Salud, Epidemiología, Nutrición)



*“El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta”
Charles Dickens (1812-1870); escritor inglés.*

Análisis de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia del género *Klebsiella* en muestras clínicas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados de un Sanatorio del Norte de México

^{2,3*}Alba-Romero José de Jesús, ¹Sánchez-De León Elías Isaac, ¹Mora-Valenzuela Marco Antonio, ¹Martínez-Valle Daniel Said, ¹Nava-Facio José Alfredo, ²Martínez-Romero Aurora.

¹Universidad Politécnica de Gómez Palacio, Durango

²División de Estudios de Postgrado e Investigación. Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED).

³Sanatorio San José de Gómez Palacio Durango SA de CV

*Email: jalbar_1@hotmail.com

RESUMEN

El aislamiento de género *Klebsiella* cada vez es más frecuente en pacientes hospitalizados y no hospitalizados, sin embargo, la presencia de *Klebsiella* multirresistente y *Klebsiella* hipervirulenta es a nivel internacional un problema en pacientes inmunosuprimidos. La formación de biopelícula y enzimas β -lactamasa y β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) son factores que se atribuyen a la resistencia a los antibióticos. Se determinó la presencia de *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. sub esp. pneumoniae* en muestras de orina, sec. faríngea, hemocultivos, sec. de herida, expectoración y lavado bronquial. Se utilizó el equipo automatizado de Vitek 2 de Biomérieux para la prueba de identificación, aislamiento y la prueba de BLEE; la determinación de biopelícula se llevó a cabo con el método cualitativo en tubo. Al analizar 77 aislados de *Klebsiella*, correspondieron a 63 cepas *Klebsiella pneumoniae* (84.01%), 4 *K. oxytoca* (5.33%), 8 *K. pneumoniae* sub especie *pneumoniae* (10.66%). Las cepas aisladas fueron formadoras de biopelículas en su totalidad y se encontró que las cepas de pacientes hospitalizados son formadoras de BLEE en comparación con las cepas aisladas de pacientes no hospitalizados. Por lo que se concluye que los aislados de *K. pneumoniae* son frecuentes tanto en muestras clínicas de pacientes hospitalizados como en no hospitalizados, sin embargo, pacientes no hospitalizados también están expuestos a este patógeno y en ocasiones como contaminante.

ABSTRACT

The isolation of the *Klebsiella* genus is becoming more and more frequent in hospitalized and non-hospitalized patients, however, the presence of multiresistant *Klebsiella* and hypervirulent *Klebsiella* is an international problem in immunosuppressed patients. Biofilm formation and extended spectrum β -lactamase and β -lactamase enzymes (ESBL) are factors attributed to antibiotic resistance. The presence of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* and *K. sub esp. pneumoniae* in urine samples, sec. pharyngeal, blood cultures, sec. wound, expectoration and bronchial lavage. Biomérieux's Vitek 2 automated equipment was used for identification, isolation and ESBL testing; biofilm determination was determined by the qualitative tube method. When analyzing 77 *Klebsiella* isolates, they corresponded to 63 *Klebsiella pneumoniae* strains (84.01%), 4 *K. oxytoca* (5.33%), 8 *K. pneumoniae subspecies pneumoniae* (10.66%). The isolates were fully biofilm-forming and strains from hospitalized patients were found to be ESBL-forming compared to strains isolated from non-hospitalized patients. Therefore, we conclude that *K. pneumoniae* isolates are frequent in clinical samples from hospitalized and non-hospitalized patients, however, non-hospitalized patients are also exposed to this pathogen and sometimes as a contaminant.

INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) es un patógeno causante común de diversas infecciones nosocomiales, como neumonía, infección del tracto urinario, infección abdominal y bacteriemia. A *K. pneumoniae* hoy se le reconoce como una amenaza urgente para la salud humana debido a la aparición de cepas multirresistentes asociadas con brotes hospitalarios y cepas hipervirulentas asociadas con infecciones graves adquiridas en la comunidad (Shao, C., 2021). Es un bacilo Gram negativo miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Durante la última década, *K. pneumoniae* se ha convertido en una importante amenaza clínica para la salud pública debido a la creciente prevalencia de infecciones asociadas a la atención sanitaria causadas por cepas multirresistentes productoras de β -lactamasas y/o carbapenemasas de espectro extendido (Wyres, K. L., 2020). También ha surgido un fenómeno paralelo de infecciones graves adquiridas en la comunidad causadas por *K. pneumoniae* "hipervirulenta" (Kphv) asociado con cepas que expresan factores de virulencia adquiridos. Debido a que las cepas de Kphv resistentes a carbapenémicos pueden causar infecciones graves e intratables en individuos sanos, la aparición de estas cepas representa una gran amenaza para la salud pública (Song, L., 2021) Muchos estudios que involucran a *K. pneumoniae* se enfocan en aislamientos clínicos de humanos. Se sabe poco sobre la aparición de *K. pneumoniae* en animales sanos y si los linajes o elementos genéticos asociados con infecciones humanas están presentes en la población animal, sin embargo, nuestro conocimiento de la propagación de patógenos de los animales a los humanos es de suma importancia, ya que los animales pueden actuar como reservorios de la infección clínica humana por *K. pneumoniae* (Franklin-Alming, FV., 2021). En los últimos años se hace hincapié en la proliferación de cepas resistentes y multirresistentes a los antibióticos principalmente en las infecciones adquiridas en hospitales tanto públicos como privados. Además, en la actualidad se describe un nuevo tipo de variante virulenta de Kp, conocido como Kp hipervirulenta (Kphv), que se asocia con infecciones adquiridas en la comunidad, ha surgido en todo el mundo durante las últimas tres décadas (Xu, M., 2019). Kphv infecta tanto a personas sanas como inmunodeprimidas con mayor facilidad, tiene una morbilidad y mortalidad más significativas que el "clásico" (Zhong, X. S., 2021; Choby, J. E., 2020). Por lo que es necesario establecer la prevalencia de cepas Kphv en las infecciones adquiridas en la comunidad.

Las cepas de *K. pneumoniae* aisladas tanto de hospitales como en la comunidad, presentan una resistencia a los carbapenémicos en las enterobacterias, está mediada principalmente por la producción de enzimas hidrolizantes de carbapenémicos (carbapenemasas), entre las cuales *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (Kpc), metalo- β -lactamasas (VIM, IMP, NDM) y el tipo de enzimas OXA-48 son las más comunes. (Sharahi, J. Y., 2021)

Objetivo General

Analizar la resistencia a los antibióticos y factores de virulencia de *K. pneumoniae* en muestras clínicas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados de un Sanatorio del norte de México.

Objetivo Específico

- 1.- Aislar e identificar en medios de cultivo específicos a *K. pneumoniae*.
- 2.- Determinar la resistencia a los antibióticos en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de muestras clínicas.
- 3.- Determinar la presencia de los factores de virulencia β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y formación de biopelícula en cepas de *K. pneumoniae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 355 muestras clínicas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados para el aislamiento, identificación, análisis de la resistencia a los antibióticos y factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* desde enero hasta octubre de 2021 en un Sanatorio del norte de México. Se clasificaron las muestras por sitios anatómicos, los cuales fueron orina, secreción bronquial, hemocultivos, líquido cefalorraquídeo, secreción de herida, expectoración y lavado bronquial. Se sembraron en medios de cultivo específicos como el agar Mac Conkey para bacterias Gram negativas y agar Casman con sangre. Se incubaron entre 18 y 24 h a 36.5 °C. Los hemocultivos se incubaron en sistema automatizado BACT/ALERT® 3D 60. Los hemocultivos positivos se sembraron en los mismos medios de cultivo. Todos los procedimientos se realizaron en cabina de bioseguridad clase IIA. Al obtener los crecimientos bacterianos se procedió a tipificar los géneros y especies respectivamente, así como, la sensibilidad a los antimicrobianos se realizó por el método Vitek 2 de Biomérieux (Lee, CR., 2017). La interpretación del género

especie fue por porcentaje de probabilidad siendo el más alto 99%, la sensibilidad a los antimicrobianos fue por concentración mínima inhibitoria bajo los criterios de CLSI 2020. Para la determinación de biopelícula se utilizaron cultivos crecidos durante la noche en caldo LB, se prepararon diluciones 1:100 en caldo fresco LB y después se dispuso 0.1 mL del medio recientemente inoculado dentro de los pozos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pozos. La placa se incubó a 37°C durante 8 h sin agitación. La biopelícula se detectó al teñir los pozos con 10 µL de cristal violeta [0.1% (w/v) en H₂O], después de realizada la tinción la placa se incubó por otros 15 min a temperatura ambiente y después se lavó exhaustivamente con agua destilada para remover células planctónicas y residuos del colorante. Se utilizó etanol (95%) para eluir el cristal violeta de los pozos que contenían la biopelícula y la absorbancia del colorante solubilizado se midió a 590 nm utilizando un lector de placas de microtitulación. Los ensayos se realizaron por triplicado en tres diferentes ocasiones (Karatuna O., 2010).

RESULTADOS

Se analizaron 355 muestras clínicas de las cuales 77 aislamientos fueron del género *Klebsiella*, **Figura 1** el cual, corresponde al 22% de los aislados el resto correspondió a otros microorganismos. De los 77 aislados, para *Klebsiella pneumoniae* 63 cepas (84.01%), *K. oxitoca* 4 (5.33%), *K. pneumoniae* sub especie *pneumoniae* 8 (10.66%). En muestras de pacientes hospitalizados se aislaron 49 cepas correspondiendo al 63.63% y en muestras de pacientes no hospitalizados fueron 36.36%, **Figura 2 a y b**. Se probaron 19 antibióticos contenidos en las tarjetas de pruebas de sensibilidad para Gram negativos del sistema Vitek 2 de Biomerieux. Se hizo un análisis porcentual de cada antibiótico por cada serie y en cada cepa de *Klebsiella*, encontrando que las cepas de pacientes hospitalizados muestran mayor resistencia a los antibióticos que las muestras de los pacientes no hospitalizados, **Figura 3 a. 3 b**. La producción de BLEE y la producción de biopelícula en las cepas de *Klebsiella* es muy similar, sin embargo, la mayor producción de los factores de virulencia se presentó en cepas de pacientes hospitalizados.



Figura 1. Cultivos realizados y cultivos positivos para *Klebsiella pneumoniae*

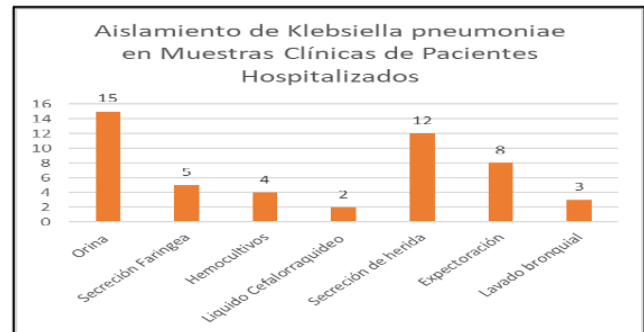


Figura 2 a. Aislados del género *Klebsiella* en pacientes hospitalizados

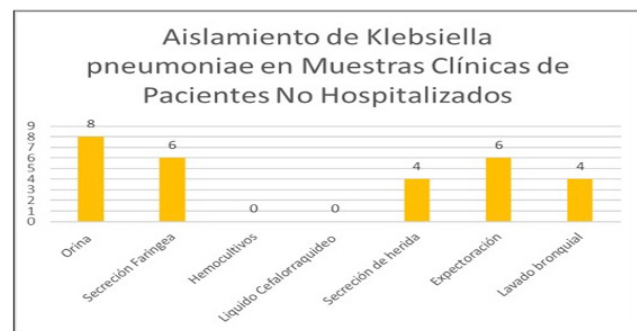


Figura 2 b. Aislados del género *Klebsiella* en pacientes no hospitalizados

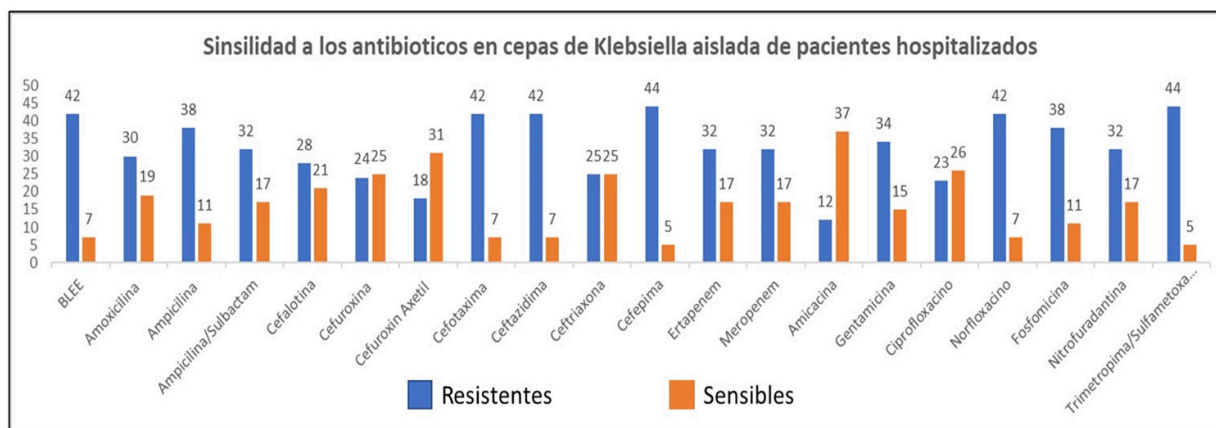


Figura 3 a. Resistencia a fármacos del género *Klebsiella*

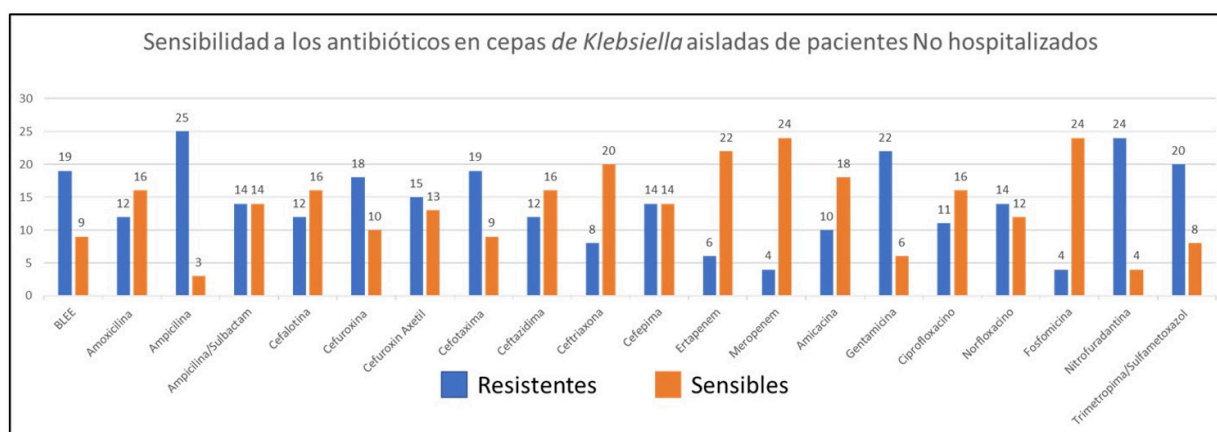


Figura 3 b. Resistencia a fármacos del género *Klebsiella*

DISCUSIÓN

El aislamiento de *K. pneumoniae* en muestras clínicas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados es con mayor frecuencia y constituye un indicador epidemiológico de riesgo debido a que constituye el riesgo de adquirir un infección o coinfección por cepas multirresistentes e hipervirulentas, tal como lo describen Zhong, X. S. y col. el año 2020 y Lee CR., en el año 2021 al establecer que en las infecciones por *K. pneumoniae* adquiridas en el área urbana también son Kphv lo cual coincide con nuestros resultados obtenidos. Al determinar que, de 355 cultivos positivos a diferentes microorganismos, 77 aislamientos correspondieron a *K. pneumoniae*, *K. oxitoca* y *K. pneumoniae* sub. esp. *pneumoniae* es un hecho que pone de manifiesto la necesidad de vigilancia en las infecciones adquiridas en la atención de la salud (IAAS) y en la comunidad; en las IAAS la incidencia de cepas de Kphv constituye un factor de riesgo para cualquier institución de salud porque su índice de morbilidad y mortalidad será alto (Pajand O., 2020). Las infecciones adquiridas en la comunidad

por *K. pneumoniae* se constituyen como multifactorial, es decir, por enfermedades crónico degenerativas que le dan una vulnerabilidad inmunológica al paciente y además los animales con los que convive también constituye un factor de riesgo para estos pacientes tal como lo ha descrito Franklin-Alming, F. V., en el año 2021 que *K. pneumoniae* prolifera con mucha frecuencia en animales. La resistencia de las cepas de *K. pneumoniae* en este estudio han descrito la aparición de cepas con resistencia y multirresistencia a múltiples antibióticos, además, formadoras de factores de virulencia, lo cual, coincide con lo descrito por Lan, P., 2021. Al describir la aparición de las llamadas cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*, las cuales pueden presentar ambos fenotipos que codifican para múltiples factores de virulencia contribuyen a la hipervirulencia, los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos contribuyen a la síntesis de enzimas betalactamasas de espectro extendido.

CONCLUSIONES




Los aislados de *K. pneumoniae* son frecuentes en muestras clínicas tanto de pacientes hospitalizados como en no hospitalizados, la resistencia a los antibióticos y la producción de factores de virulencia están relacionados, lo que permite que *K. pneumoniae* sea un patógeno de mayor incidencia a nivel hospitalario, sin embargo, pacientes no hospitalizados también están expuestos a este patógeno y en ocasiones como contaminante. La producción de biopelícula y de BLEE, son aspectos que ponen de manifiesto el riesgo epidemiológico principalmente en pacientes inmunosuprimidos.

REFERENCIAS



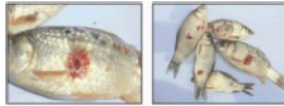
- Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2020). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *Journal of internal medicine*, 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>.
- Franklin-Alming, FV, Kaspersen, H., Hetland, M., Bakksjø, RJ, Nesse, LL, Leangapichart, T., Löhr, IH, Telke, AA y Sunde, M. (2021). La exploración de *Klebsiella pneumoniae* en aves de corral sanas revela una alta diversidad genética, buenas capacidades de formación de biopelículas y una mayor prevalencia en pavos que en pollos de engorde. *Fronteras en microbiología*, 12, 725414. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725414>.
- Lan, P., Jiang, Y., Zhou, J., & Yu, Y. (2021). A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of global antimicrobial resistance*, 25, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.020>.
- Lee, CR, Lee, JH, Park, KS, Jeon, JH, Kim, YB, Cha, CJ, Jeong, BC y Lee, SH (2017). Resistencia a los antimicrobianos de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta: epidemiología, determinantes asociados a la hipervirulencia y mecanismos de resistencia. *Fronteras en microbiología celular e infecciosa*, 7, 483. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>.
-
-
-
-
-
- Pajand, O., Darabi, N., Arab, M., Ghorbani, R., Bameri, Z., Ebrahimi, A., & Hojabri, Z. (2020). The emergence of the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) strains among circulating clonal complex 147 (CC147) harbouring blaNDM/OXA-48 carbapenemases in a tertiary care center of Iran. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 19(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00349-z>.
- Shao, C., Jin, Y., Wang, W., Jiang, M. y Zhao, S. (2021). Un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenémicos del serotipo capsular K57 en una unidad de cuidados intensivos de emergencia de un hospital universitario en China. *Fronteras en salud pública*, 9, 724212. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.724212>.
- Shankar, C., Veeraraghavan, B., Nabarro, L., Ravi, R., Ragupathi, N., & Rupali, P. (2018). Whole genome analysis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from community and hospital acquired bloodstream infection. *BMC microbiology*, 18(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1148-6>.
- Sharahi, J. Y., Hashemi, A., Ardebili, A., & Davoudabadi, S. (2021). Molecular characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Tehran, Iran. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 20(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00437-8>.
- Song, L., Yang, X., Huang, J., Zhu, X., Han, G., Wan, Y., Xu, Y., Luan, G., & Jia, X. (2021). Phage Selective Pressure Reduces Virulence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Through Mutation of the wzc Gene. *Frontiers in Microbiology*, 12, 739319. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.739319>.
- Wyres, K. L., Lam, M., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature reviews. Microbiology*, 18(6), 344–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>.
- Xu, M., Fu, Y., Fang, Y., Xu, H., Kong, H., Liu, Y., Chen, Y. y Li, L. (2019). Alta prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta productora de KPC-2 que causa meningitis en el este de China. *Infección y resistencia a los medicamentos*, 12, 641–653. <https://doi.org/10.2147/IDR.S191892>.
-
-
-

- Karatuna, O., & Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(12), 1770-1775. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03177.x>
- Zhong, X. S., Li, Y. Z., Ge, J., Xiao, G., Mo, Y., Wen, Y. Q., Liu, J. P., Xiong, Y. Q., Qiu, M., Huo, S. T., Cheng, M. J., & Chen, Q. (2020). Comparisons of microbiological characteristics and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates from urban rodents, shrews, and healthy people. *BMC microbiology*, 20(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1702-5>
- Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 12, 642484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642484>.

Cuerpo académico UJE-CA-108 Fisiopatología en Salud Ambiental
LGAC: Bases Moleculares y Bioquímicas de la Salud Ambiental

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Nitrosaminas y óxido nítrico como derivados del metabolismo de los nitratos, su papel en la respuesta a la hipoxia mediada por HIF y su implicación en la carcinogenesis.	<p align="center">Polimorfismo</p> 	
Variabilidad genética y caracterización bioquímica de las metaloproteinasas y la toxina		
Citotoxicidad del nitrato y nitrito en distintas líneas celulares y su posible mecanismo de acción		
<p>Alteración en la síntesis de hormonas tiroideas mediada por los factores de transcripción FOXE1 y PAX8 durante la intoxicación crónica por nitratos</p> <p>Estudios de biomarcadores obesogénicos y angiogénicos (leptina, IGF-1 y VEGF) y su relación con la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer de mama.</p>		
Biomarcador de insuficiencia renal	<p align="center">Rebeca Pérez Morales</p> 	
Anemia asociada a factores ambientales en el estudiante Universitario		
Alteraciones de la glándula tiroides y determinación de oncogenes por consumo de agua contaminada por nitratos		
Interacciones medicamentosas más comunes en diferentes áreas de un hospital de alta especialidad en la Ciudad de México	<p align="center">Esperanza Yasmín Calleros Rincón</p> 	
Evaluación del daño oxidativo al ADN en niños con exposición prenatal al arsénico, flúor y compuestos organoclorados		
Evaluación de la función renal e hipertensión arterial en población expuesta a cadmio		
Detección de anticuerpos IgG e IgM contra Toxoplasma gondii en primigestantes y sus neonatos en el Hospital General de Gómez Palacio, Dgo.		

Cuerpo académico UJE-CA-125 Bacteriología Médica Diagnóstica y Salud Pública
LGAC: Factores de virulencia y drogosensibilidad de las enfermedades infecciosas y Salud Pública

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Perfil microbiológico de úlceras de pie diabético y actividad antimicrobiana	<div data-bbox="824 621 1073 646" style="text-align: center;">Aurora Martínez Romero</div> 	
Identificación de fuentes de contaminación, una estrategia de saneamiento básico en la prevención de brucelosis humana		
Evaluación del efecto inhibitor y potenciador del plasma rico en plaquetas ante fármacos en microorganismos nosocomiales y su correlación con resistencia a fármacos		
Aplicación del árbol de neem en agricultura, industria, medicina y ambiente: una revisión.		
Diagnóstico de brucelosis caprina por serología y PCR múltiple		
Aislamiento de Mycobacterium abscessus en un paciente con afección cutánea		
Asociación entre el fenotipo del sistema sanguíneo AB0 y leucemias	<div data-bbox="816 1314 1084 1339" style="text-align: center;">José de Jesús Alba Romero</div>   <p align="center"><small>Fish infected with Aeromonas hydrophila</small></p>	
Análisis de los factores de crecimiento y su efecto inhibitor en microorganismos de importancia clínica		
Aislamiento e identificación de Aeromonas productoras de biopelícula en peces del rio Nazas		
Aislamiento e identificación de microorganismos nosocomiales más frecuentes y análisis de sus factores de virulencia		
Análisis de expresión de los genes que codifican para bombas de expulsión y su correlación con resistencia a fármacos de primera y segunda línea por el método de azul de alamar en cepas de micobacterias		
Análisis de los genes lasI/lasR y rhli/rhIR como reguladores de transcripción de los factores de virulencia dependientes del Quorum sensing y su correlación a fármacos en cepas de Pseudomana aeruginosa aislada de pacientes hospitalizados		
Evaluación de los métodos para el diagnóstico de salmonelosis por ELISA y aglutinación en pacientes crónicamente expuestos	<div data-bbox="813 1707 1092 1732" style="text-align: center;">Sandra Hernández González</div> 	
Determinación de Plomo (Pb) y Arsénico (As) en cápsulas de gelatina dura y blanda para uso farmacéutico		

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PERFIL DE INGRESO

Conocimientos generales de: Química, Física, Matemáticas y Biología

Ser creativo y observador, tener capacidad de síntesis y análisis crítico

Tener espíritu emprendedor, una actividad proactiva y capacidad para trabajar en equipo.

PERFIL DE EGRESO

- Resuelve problemas en las áreas de biotecnología, ciencias de los alimentos, diagnóstico clínico, ambiental y farmacéutico
- Se dedica a la producción de bienes y servicios en las áreas relacionadas con la salud, química-farmacéutica, legal, patología, forense, diagnóstico clínico, etc.
- Se desarrolla con ética y responsabilidad la innovación de productos farmacéuticos con el propósito de mejorar la calidad de vida del paciente.



MICROBIOLOGÍA

(Clínica, Veterinaria, Vegetal)



“Los innovadores y los genios siempre han sido tratados como locos al principio (y muy a menudo al final) de sus carreras”

Feodor Dostoievski (1821-1881); novelista ruso.

Aislamiento de los miembros de la Tribu *Klebsielleae* obtenidos de suelos cercanos a hospitales y su persistencia en acero inoxidable

^{1,2}Saldaña-Padilla Andrés, ¹Carrillo-Chavez Karla, ¹Colmenero-Solís Raúl de Jesús, ²Hernández-Cortez Cecilia, ¹Gonzalez-Avila Luis Uriel, ¹Castro-Escarpulli Graciela.

¹Laboratorio de Investigación Clínica y Ambiental, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Santo Tomás C. P. 11340. Miguel Hidalgo, CDMX, México. Tel.: 57296300 Ext.: 62383

²Laboratorio de Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

*Email: chelacastro@hotmail.com

RESUMEN

El suelo es un sistema natural abierto y dinámico, formado por materia proveniente de desechos naturales y antropogénicos. Dentro de los componentes del suelo los microorganismos cumplen una gran cantidad de funciones. Estas bacterias pueden transportarse a otras superficies por medio del aire u otros organismos; dentro del ámbito de las superficies, el acero inoxidable cobra gran importancia por su posible implicación en el desarrollo de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS). A partir de 17 muestras de suelos de camellones cercanos a hospitales de México se obtuvieron 15 cepas pertenecientes a la Tribu *Klebsielleae*. Se determinó la persistencia en acero inoxidable de 10/15 cepas durante 72 h, obteniendo un valor máximo de 270 UFC/cm² en la cepa A11 de *Klebsiella pneumoniae*. Todas las cepas presentaron un perfil de multidrogorresistencia y una prueba presuntiva positiva para la producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL).

Palabras clave: *Klebsielleae*, persistencia, suelo.

ABSTRACT

The soil is an open and dynamic natural system, formed by matter from natural and anthropogenic waste. Within the components of the soil, microorganisms fulfill a large number of functions. These bacteria can be transported to other surfaces through the air or other organisms; within the field of surfaces, stainless steel is of the great importance due to its possible implication in the development of infections associated with health care. From 17 soil samples from ridges near hospitals in Mexico, 15 strains belonging to the *Klebsielleae* Tribe were obtained. The persistence in stainless steel of 10/15 strains for 72 h was determined, obtaining a maximum value of 270 CFU/cm² in the A11 strain of *Klebsiella pneumoniae*. All strains had a multidrug resistance profile and a positive presumptive test to produce extended spectrum β -lactamases (ESBL).

Key words: *Klebsielleae*, persistence, soil.

INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema natural abierto y dinámico, formado por materia proveniente de desechos naturales y antropogénicos. Posee una o ambas de las siguientes características: a) horizontes, los cuales son formados por la adición, transferencia y transformaciones de energía, b) capacidad de sostener plantas enraizadas en un entorno natural. Los suelos de forma general se encuentran compuestos de tres fases, líquido, gaseoso y sólido. Donde la fase sólida está constituida por partículas minerales, compuestos orgánicos y organismos vivos, de los cuales la mayor parte de ellos son microorganismos (Soil Survey Staff, 2014; Hartemink, 2016; NMX-AA-132-SCFI-2016).

El suelo y el papel que tiene el polvo en la transmisión de microorganismos patógenos se ha subestimado especialmente en los hospitales, en donde a diferencia de la industria el muestreo ambiental se ha eliminado y únicamente se recomienda cuando se presenta un brote. No se encuentra dilucidado hasta qué punto la contaminación ambiental contribuye al desarrollo de Infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), las cuales son definidas como aquellas infecciones contraídas por un paciente durante su estancia en el hospital y que no tenía en el momento de su ingreso o bien las infecciones que ocurren 72 horas posteriores al egreso del paciente, dentro de las IAAS se destacan las infecciones del torrente sanguíneo, las neumonías asociadas a ventilador, infección de vías urinarias y las infecciones de sitio quirúrgico. Estas infecciones tienen altos índices de mortalidad además de generar un incremento en los días de hospitalización y costos de la atención (OMS, 2003; NOM-045-SSA2-2005; OMS, 2019).

Se reconocen tres fuentes de las que provienen los microorganismos causantes de IAAS: a) la microbiota propia del paciente, b) los microorganismos presentes en otros pacientes, personal médico y visitantes, c) patógenos del ambiente hospitalario, de los cuales el 20 % de éstos microorganismos provienen del medio ambiente (López-Cerero, 2014; Otter *et al.*, 2014; Saka *et al.*, 2017).

Los principales agentes etiológicos de IAAS asociados a infecciones del torrente sanguíneo son bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea* éstos últimos 4 géneros son parte de la tribu Klebsielleae, un antiguo sistema de clasificación de la familia *Enterobacteriaceae* que facilita la identificación preliminar (RHOVE, 2015).

Existen diferentes clasificaciones de la familia *Enterobacteriaceae*, la propuesta por Edwards y Ewing (1986), consistió en un sistema de clasificación en tribus que se apoyó en los resultados de pruebas bioquímicas. La tribu *Klebsielleae* se conforma por aquellos géneros de enterobacterias que presentan una reacción positiva a la prueba de Voges-Proskauer, está formada por los géneros: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Hafnia*, *Raoultella*, *Cronobacter*, *Kosakonia*, *Lelliottia*, *Pluralibacter*, los primeros géneros poseen especies que podrían ser agentes etiológicos de IAAS (Koneman & Allen, 2008; Procop *et al.*, 2017; Castro-Escarpulli, 2020).

Por otro lado, los miembros de esta tribu tienen la capacidad de persistir en superficies bióticas y abióticas por lo que la persistencia bacteriana es un conjunto heterogéneo de fenómenos fisiológicos que implican una variación fenotípica no heredable que se activa como respuesta a la exposición al estrés, lo que permite

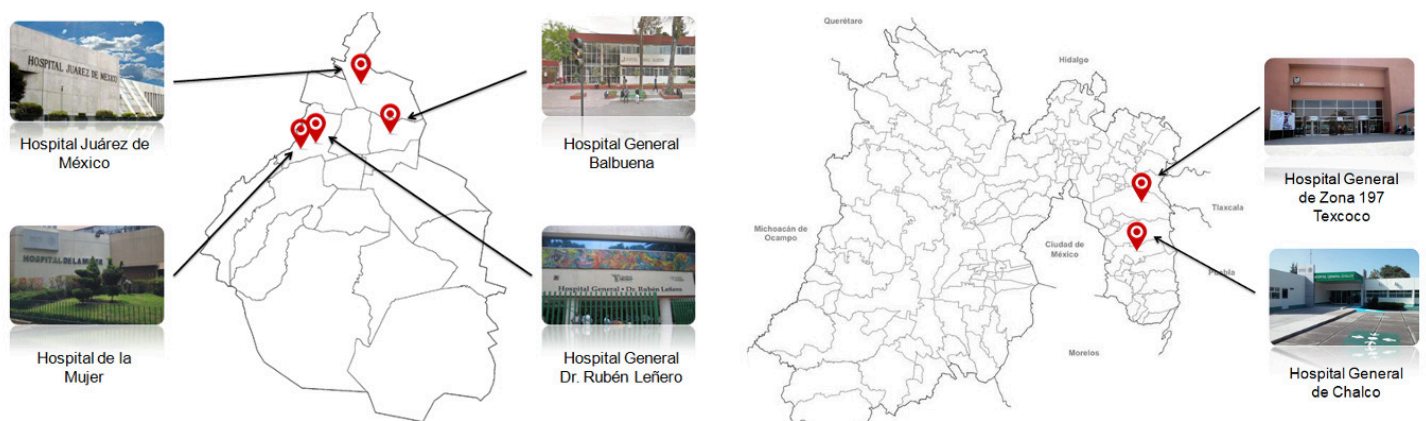


Figura 1. Localización de los puntos de muestreo

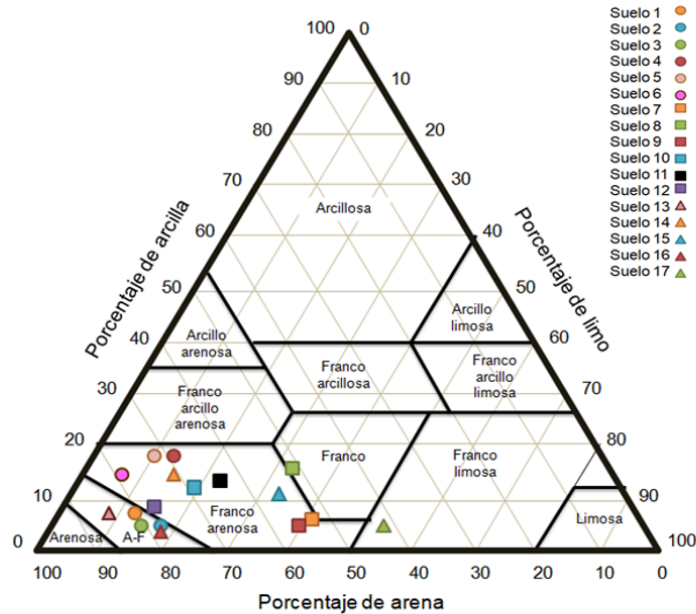


Figura 2. Tipo de textura del suelo obtenida con base en el triángulo de Bouyoucos

la adaptación y supervivencia de una subpoblación denominada persistente (Kramer *et al.*, 2006; Suclupe-Campos & Aguilar-Gamboa, 2020).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener aislados de la Tribu *Klebsielleae* a partir de muestras de suelo cercanas a hospitales y determinar su capacidad de persistir en superficies de acero inoxidable.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó con muestras de suelo de camellones cercanos a hospitales de distintas regiones de la Ciudad de México y el Estado de México durante el periodo comprendido de agosto a septiembre del 2019 con base en lo establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se procedió a determinar las propiedades fisicoquímicas del suelo, según dicha norma. Los aislados se obtuvieron con base en lo reportado por Mohamed-Noor y colaboradores en el 2012 y Davis y colaboradores en el 2005 (figura 1).

Se realizó la prueba de oxidasa y la tinción de Gram, seleccionando a aquellos aislados Gram negativos y con una prueba de oxidasa negativa. De los aislados seleccionados se inoculó la galería de pruebas bioquímicas EnteroPluri®-Test con base en las indicaciones del fabricante. La evaluación de la persistencia de las cepas se realizó de acuerdo con lo reportado por Rodarte en 2019. A las cepas identificadas se les realizó la prueba de sensibilidad con los antibióticos recomendados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)

por la técnica de difusión en disco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 17 muestras analizadas se identificaron 5/17 suelos con una textura areno francoso, 10/17 franco arenosos, 1/17 suelos francos y 1/17 se identificó como suelo franco limoso (figura 2).

Se obtuvieron 5/17 suelos con muy alto contenido, 7/10 muestras poseen un nivel medio y 5/17 alto contenido de materia orgánica. De 17 suelos estudiados: 15/17 presentan un valor de pH medianamente alcalino, 1/17 corresponden a valores neutro y 1/17 de las muestras a fuertemente alcalino. Estos valores concuerdan con el valor reportado en la norma ambiental NADF-006-RNAT-2016 en la que las áreas verdes públicas deben tener un suelo tipo franco arenoso o franco. Asimismo, los resultados son similares a lo reportado en suelos urbanos obtenidos de aceras de Nueva York por Grabosky y Bassuk en el 2016. Los riesgos de patógenos ambientales son difíciles de estimar, sin embargo, en el suelo dependen de la supervivencia y replicación del microorganismo (Becerra-Castro *et al.*, 2015). En el estudio de Côté y Quessy en 2005, las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli* y *Salmonella* spp.) sobreviven de 68 a 80 días en suelos franco arenosos y areno francosos, al comparar con el tipo de textura, este tipo de suelos corresponde con los valores obtenidos en el estudio por lo que en estos podría existir la replicación y supervivencia de los miembros de la tribu *Klebsielleae*.

Se realizó la resiembra en medio MacConkey y en medio Dibicrom Urocult, obteniendo un total de 15 aislados con morfotipo colonial sugerente de la tribu *Klebsiellae* (figura 3).

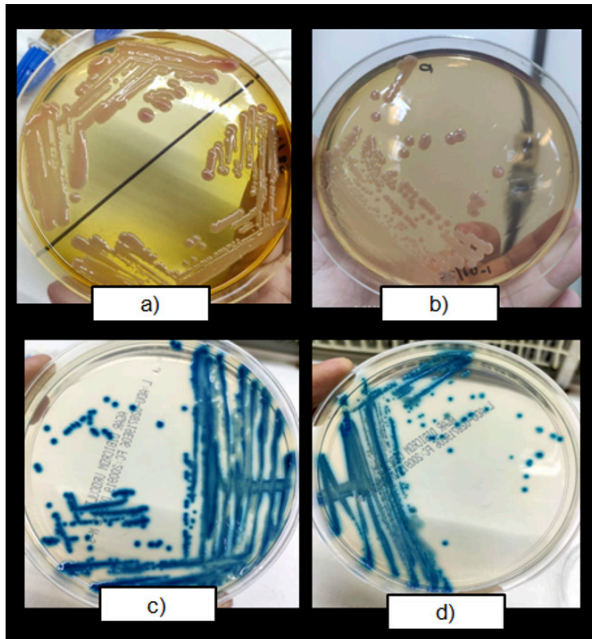


Figura 3. Morfotipo colonial de algunos de los aislados. a) y b) Morfotipo colonial de tres de los aislados obtenidos en gelosa MacConkey; los cuales son colonias circulares, lactosa negativa, convexas, de bordes enteros, lisas, brillantes y de consistencia mucóide. c) y d) Morfotipo observada en todos los aislados de la tribu *Klebsiellae* en medio Dibicrom Urocult, se observan colonias azules, circulares, convexas, lisas, brillantes.

Se identificaron como *P. agglomerans* (7), *E. cloacae* (2), *K. pneumoniae* (2), *K. ozaenae* (3) y *S. rubidaea* (1) (figura 4).

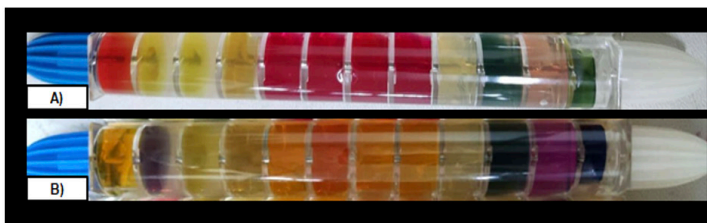


Figura 4. Ejemplo del panel bioquímico obtenido en el sistema Enteropluri®-Test. A) Galería de pruebas bioquímicas sin inocular, B) Panel bioquímico obtenido después de la inoculación e incubación de la cepa A10 correspondiente a *K. pneumoniae*.

Las cepas de los miembros de la tribu *Klebsiellae* fueron aisladas de suelos de textura franca con pH alcalino, al comparar con los estudios realizados por Kandil en 2017 y por Hingole y Pathak en el 2016 en suelos de

tipo franco en India y Egipto se obtuvieron aislados de *Klebsiella* spp., y de *P. agglomerans*, por lo que es probable que este tipo de suelos se encuentre relacionado con estas especies. Que las cepas aisladas sean originarias del suelo es probable, debido a que la mayoría de estas especies fungen como bacterias fijadoras de nitrógeno, pero las posibles causas del origen de estos microorganismos son variadas. La contaminación con residuos humanos y animales es una de las principales causas. En estas zonas los habitantes realizan actividades de recreación con sus mascotas por lo que la contaminación fecal por parte de los animales puede introducir éstos patógenos al suelo dado que con base en lo reportado por Riwu y colaboradores en el 2020, la materia fecal de humanos y animales introduce una gran cantidad de enterobacterias en el medio ambiente. Asimismo, el riego con aguas tratadas es otra causa por las que se aislaron estos microorganismos, esta hipótesis está fundamentada en el estudio realizado en Xochimilco por Mazari-Hiriart y colaboradores en el 2008, en el que se reportó que los suelos de uso agrícola y los efluentes con los que fueron regados contenían grandes cantidades de bacterias entre las que destacan *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Salmonella* spp., y *P. agglomerans*, los cuales son similares a los obtenidos en el presente estudio.

Se realizó el análisis de la persistencia sobre superficies de acero inoxidable en 10/15 cepas obtenidas, se demostró que de las cepas identificadas como *P. agglomerans* la cepa A2 persistió hasta las 72 h con un valor de 237 UFC/cm²; la cepa A12 persistió el mismo tiempo, con un valor de 4 UFC/cm², en contraste la cepa A6 no mostró persistencia. En el caso de las cepas de género *Klebsiella*, la cepa A11 de *K. pneumoniae* presentó el valor máximo a las 72 h con 270 UFC/cm², contrario a la cepa A10 que persistió el mismo tiempo con un valor de 27 UFC/cm². La única cepa de *K. ozaenae* se determinó una cuenta de 8 UFC/cm²; mientras que 2/3 cepas de *K. ozaenae* no persistieron. La cepa A5 de *E. cloacae*, persistió de igual forma hasta las 72 h, con un valor de 24 UFC/cm² (figura 5).

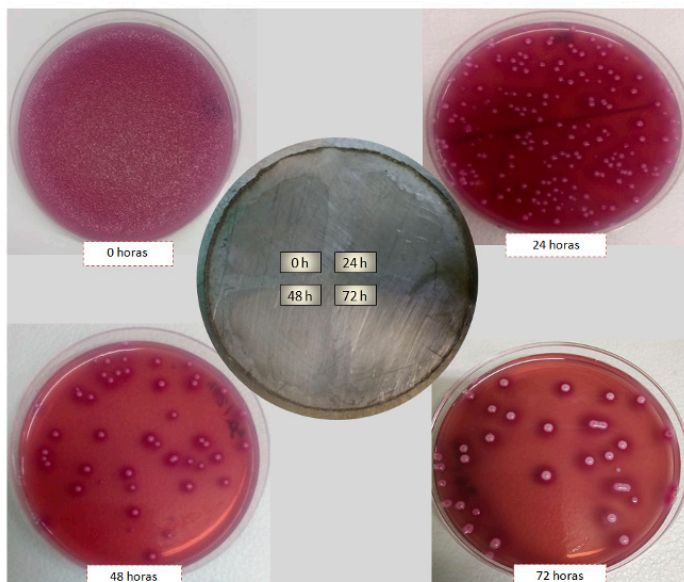


Figura 5. Ejemplo del experimento de persistencia en superficies de acero inoxidable de la cepa A10. En la parte central se muestra el disco de acero inoxidable 132 utilizado en la determinación de la persistencia de las cepas durante 4 días. Cada 24 h y hasta las 72 h se tomó un inóculo de un segmento del disco de acero inoxidable el cual se inoculó en placas de gelosa MacConkey, posterior a la incubación se realizó la cuenta viable de las UFC.

El estudio realizado por Rodarte en el 2019, en condiciones similares de experimentación, con cepas clínicas de *K. pneumoniae* obtuvo un valor máximo de persistencia a las 96 h, los valores obtenidos en el presente estudio con cepas ambientales fueron menores que los reportados por Rodarte en el 2019, pero es posible suponer que cepas que persistieron hasta las 72 h pueden persistir durante más tiempo. De manera similar Kramer y colaboradores en el 2006 informaron que la persistencia en superficies abióticas de cepas clínicas de *K. pneumoniae* es de hasta 30 meses. La variación obtenida en los valores de persistencia es debida a las condiciones del experimento pues, las persistencias más largas se encuentran descritas en metodologías que ocupan mayores inóculos y soluciones diluyentes con contenido de proteínas.

El patrón de susceptibilidad antimicrobiana (cuadro 1), determinada con base a la familia de antimicrobianos probados, demostró que 15/15 de las cepas, fueron resistentes para la cefalotina y 10/15 para la cefotaxima, para los aminoglucósidos 2/15 de las cepas fueron resistentes, 5/15 presentan resistencia a las tetraciclinas, 3/15 de las cepas presentaron resistencia a la colistina, para los macrólidos 15/15 de las cepas presentaron resistencia, 2/15 presentan resistencia a 48 las quinolonas y en el caso de la familia de los carbapenémicos 15/15 de las cepas fueron sensibles.

Cuadro 1. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de la Tribu *Klebsielleae*

Clave	Identificación	Antimicrobiano														Perfil			
		P	AM	ATM	CF	CTX	GM	D	SXT	IPM	MEM	CL	E	NA	CC		FOX	CAZCLIA	CTXCLIA
A1	<i>P. agglomerans</i>	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A2	<i>P. agglomerans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A6	<i>P. agglomerans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A7	<i>P. agglomerans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A8	<i>P. agglomerans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A12	<i>P. agglomerans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A13	<i>P. agglomerans</i>	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A10	<i>K. pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A11	<i>K. pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A9	<i>K. ozaenae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	-	MDR
A16	<i>K. ozaenae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	-	MDR
A17	<i>K. ozaenae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	-	MDR
A4	<i>E. cloacae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A5	<i>E. cloacae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR
A14	<i>S. rubidaea</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Intermedio	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	ESBL	ESBL	MDR

Resistente Sensible Intermedio * Sin dato ESBL - No ESBL

Estos resultados son similares a lo reportado por Alouache y colaboradores (2014), Markovska y colaboradores (2014) y Barrios y colaboradores (2017), en los que se determinó que los miembros de la Tribu *Klebsiellae* expresan ESBL de forma intrínseca de esta forma, se explica la resistencia a las penicilinas, aunque es necesario un estudio de estos mecanismos de resistencias a profundidad. Por otro parte, el hecho de que todas las cepas fueran sensibles a los carbapenémicos es comparable con lo reportado por Delétoile y colaboradores en el 2009, Mohamudha y colaboradores en el 2012, y por AbdAlhussen y Darweesh en el 2016, donde se encontró una baja resistencia a imipenem y meropenem. La obtención de bacterias persistentes y posibles productoras de ESBL indica que es necesario la vigilancia y estudios más detallados hacia estas bacterias, porque se aislaron bacterias que pueden ser causantes de IAAS y debido a la cercanía con la que se aislaron dichas cepas de hospitales de segundo nivel de atención, estos microorganismos pueden tener implicaciones clínicas y estar relacionadas a brotes en estos hospitales.

CONCLUSIÓN

Todas las cepas de la tribu *Klebsiellae* fueron aisladas de suelos de textura gruesa, con un contenido de materia orgánica que va de medio a alto y un pH alcalino. La persistencia en acero inoxidable de las cepas probadas fue hasta las 72 h lo que podría ser un riesgo en el área hospitalaria. Las cepas de la tribu *Klebsiellae* evaluadas presentaron resistencia a las penicilinas y cefamicinas; y fueron sensibles a los aminoglucósidos, tetraciclinas, carbapenémicos, polimixinas y quinolonas.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS

Los autores declaran no existen conflictos de intereses

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo formó parte de Proyecto Sistema CRISPR-Cas una nueva alternativa de identificación bacteriana (SIP 2021351) apoyado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Graciela Castro- Escarpulli recibe becas de Estímulos al Desempeño de los Investigadores Investigación, Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (Instituto Politécnico Nacional), Cecilia Hernández-Cortez y Graciela Castro- Escarpulli reciben beca del Sistema Nacional de Investigadores (SNI, CONACyT). Andrés Saldaña-Padilla y Luis

Uriel Gonzalez-Avila reciben beca de CONACyT y del Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN)

REFERENCIAS

- AbdAlhussen, L. S., Darweesh, M. F. Prevalence and antibiotic susceptibility patterns of *Pantoea* spp. isolated from clinical and environmental sources in Iraq. *International Journal of ChemTech Research* 2016; 9: 430-7.
- Alouache, S., Estepa, V., Messai, Y., Ruiz, E., Torres, C., Bakour, R. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance* 2014; 20: 30-38.
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Mejia-Miranda, I., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Mosqueda-García, D., *et al.*. ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017; 10: 243-246.
- Becerra-Castro, C., Lopes, A. R., Vaz-Moreira, I., Silva, E. F., Manaiá, C. M., Nunes, O. C. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environment International* 2015; 75: 117-135.
- Castro-Escarpulli, G. Familia *Enterobacteriaceae*: diferenciación de tribus. 1ª. edición. México: Bacteriología Médica Diagnóstica, 2020. 22-26.
- Côté, C., Quessy, S. Persistence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in surface soil following application of liquid hog manure for production of pickling cucumbers. *Journal of Food Protection* 2005; 68: 900-905.
- Davis, E. D., Joseph, S. J., Jansen, P. H. Effects of growth medium, inoculum size and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71: 826-834.
- Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., *et al.*. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 300-310.
-

- Ewing, W. H. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4a edición. USA: International Journal of Systematic Bacteriology, 1986. 581-582.
- Grabosky, J., Bassuk, N. Seventeen years' growth of street trees in structural soil compared with a tree lawn in New York City. *Urban Forestry & Urban Greening* 2016; 16: 103-109.
- Hartemink, A. E. The definition of soil since the early 1800s. *Advances in Agronomy* 2016; 137: 73-126.
- Hingole, S. S., Pathak, A. P. Isolation of halotolerant plant growth promoting *Klebsiella pneumoniae* from Tuppa, Nanded, Maharashtra. *International Journal of Innovative Biological Research* 2016; 5: 5-9.
- Kandil, M. M. Characterization of *Pantoea* Sp. strain MK1D, and *Erwinia* sp. strain MK2Y as tricalcium phosphate dissolving bacteria isolated from calcareous soil. *Alexandria Science Exchange Journal* 2017; 38: 335-342.
- Koneman, E. Allen, S. Koneman. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2008.
- Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC infectious diseases* 2006; 6: 1-8.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al.,. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18: 268-281.
- Markovska, R. D., Stoeva, T. J., Bojkova, K. D., Mitov, I. G. Epidemiology and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a bulgarian hospital. *Microbial Drug Resistance* 2014; 20: 131-137.
- Mazari-Hiriart, M., Ponce-de-Leon, S., López-Vidal, Y., Islas-Macías, P., Amieva-Fernández, R. I., Quiñones-Falconi, F. Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico City. *PLoS One* 2008; 3: e2305.
- Mohamed-Noor, S.E., Shuaib, Y.A., Suliman, S. E., Abdalla, M.A. Study of microbial contamination of broilers in modern abattoirs in Khartoum State. *Food Tecnology* 2012; 36: 74-80.
- Mohamudha P.R., Manivannan, S., Harish, B.N., Parija S.C. (2012). Study of CTX-M Type of Extended Spectrum β -Lactamase among Nosocomial Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in South India. *Indian Journal of Microbiology* 2012; 52: 35-40.
- NADF-006-RNAT-2016. Norma Ambiental para el Distrito Federal. Que establece los requisitos, criterios, lineamientos y especificaciones técnicas que deben cumplir las autoridades, personas físicas o morales que realicen actividades de fomento, mejoramiento y mantenimiento de áreas verdes en la Ciudad de México. [monografía en internet]. CDMX, México: Gaceta Oficial de la Ciudad de México, [consultado el 13 de abril de 2018]. Disponible en: http://www.paot.org.mx/centro/normas/a/2018/GOCDMX_13_04_2018.pdf
- NMX-AA-132-SCFI-2016. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales, metaloides y manejo de muestras. [monografía en internet]. CDMX, México: Diario Oficial de la Federación, [consultado el 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/nmx-aa-132-SCFI-2006.pdf>
- NOM-021-SEMARNAT-2000. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales, metaloides y manejo de muestras. [monografía en internet]. CDMX, México: Diario Oficial de la Federación, [consultado el 6 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>
- NOM-045-SSA2-2005. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. [monografía en internet]. CDMX, México: diario Oficial de la Federación, [consultado el 20 de noviembre de 2019]. Disponible en: https://www.pediatrica.gob.mx/archivos/burbuja/13.1_NOM-045-SSA2-2005.pdf
- OMS. Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía práctica. 2. Malta. [monografía en internet]. CDMX, México: Organización Mundial de la Salud, 2003 [consultado el 13 de abril de 2018]. Disponible en: https://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf

- OMS. Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. [monografía en internet]. CDMX, México: Organización Mundial de la Salud, 2019 [consultado el 1 de mayo de 2019]. Disponible en: https://www.who.int/gpsc/country_work/summary_20100430_en.pdf
- Ostria-Hernandez, M. L., Juárez-de la Rosa, K. C., Arzate-Barbosa, P., Lara-Hernández, A., Sakai, F., Ibarra, J. A., *et al.*. Nosocomial, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Mexico City produce robust biofilms on abiotic surfaces but not on human lung cells. *Microbial Drug Resistance* 2017; 24: 422-433.
- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., *et al.*, (2017). Koneman's. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. (7th) ed: Jones & Bartlett Learning, 2017. 229-235, 269-277
- RHOVE. (2015). Informe anual 2015. [monografía en internet]. CDMX, México: Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, 2019 [consultado en 2015]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212974/infoanual_rhove_2015.pdf
- Riwu, K. H. P., Effendi, M. H., Rantam, F. A. A review of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella pneumoniae* and multidrug resistant (MDR) on companion animals. *Systematic Reviews in Pharmacy* 2020; 11: 270-277.
- Rodarte, A. Relación de las fenovariedades de *Klebsiella pneumoniae* y su persistencia en superficies abióticas. (tesis de maestría) Ciudad de México: Instituto Politécnico Nacional, 2019
- Soil Survey Staff. Keys to soil taxonomy (12 th ed.). [monografía en internet]. CDMX, México: EUA: USDA-United States Department of Agriculture, 2014 [consultado en 2019]. Disponible en: https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/class/taxonomy/?cid=nrcs142p2_053580
- Suclupe-Campos, D. O., Aguilar-Gamboa, F. R. Persistencia bacteriana: un fenotipo celular de importancia clínica en infecciones crónicas y recurrentes. *Horizonte Médico* 2020; 20: 77-87.

Evaluación de la formación de biopelícula en cepas de *Aeromonas* spp., aisladas de carne de pollo

¹Gonzalez-Avila Luis Uriel, ¹Villanueva-González Kirvi Daniel, ¹Martínez-Trejo Arturo, ¹Colmenero-Solís Raúl de Jesús, ¹Castro-Escarpulli Graciela, ²Hernández-Cortez Cecilia

¹Laboratorio de Investigación Clínica y Ambiental, ²Laboratorio de Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

*Email: cecihercor@hotmail.com

RESUMEN

Los alimentos de consumo humano son vehículos de infecciones, por contaminación que sucede en la producción, preparación y conservación de estos, lo que favorece la presencia y desarrollo de microorganismos como *Aeromonas*, asociado a enfermedades gastrointestinales y extraintestinales en humanos. En diferentes estudios se ha demostrado la capacidad que tiene *Aeromonas* de formar biopelícula, asociada a la persistencia en superficies bióticas y abióticas, como las superficies donde se preparan los alimentos. Por lo anterior, en esta investigación se evaluó la formación de biopelícula de cepas de *Aeromonas* aisladas de carne de pollo que se consume en la Ciudad de México. Se determinó la capacidad de formación de biopelícula de 37 cepas a 4, 28 y 42 °C, con el método de cristal violeta y se clasificaron como altas, moderadas y bajas formadoras de biopelícula. Adicionalmente, se demostró la presencia del operón *pls*, asociado a la formación de biopelícula. Finalmente, se determinó la clonalidad existente por ERIC-PCR. Se determinó que el 70 % de las cepas formaban biopelícula, el 24.3 % fueron altas formadoras de biopelícula, el 35.1 % moderadas, el 10.8 % fueron bajas formadoras y el 30 % no formaron biopelícula, además, se demostró que a 4 °C se favorecía la formación de biopelícula. Se detectaron los genes *plsA* en 8/26 de las cepas, el gen *plsB* en 0/26 y el gen *plsD* en 1/26. A la luz de los resultados se concluyó que la formación de biopelícula en las cepas estudiadas fueron temperatura y cepa dependiente, y que la formación de biopelícula no depende de la presencia del clúster *pls*, además no se demostró diversidad genética entre las cepas mediante el análisis por ERIC-PCR.

Palabras clave: *Aeromonas*, alimentos, biopelícula

ABSTRACT

The food for human consumption are vehicles of infections, due to contamination that occurs in the production, preparation and conservation of these, which favors the presence and development of microorganisms such as *Aeromonas*, associated with gastrointestinal and extra-intestinal diseases in humans. Different studies have shown the ability of *Aeromonas* to form biofilm, associated with persistence on biotic and abiotic surfaces, such as surfaces where food is prepared. Therefore, this research evaluated the biofilm formation of *Aeromonas* strains isolated from chicken meat consumed in Mexico City. The biofilm formation capacity of 37 strains was determined at 4, 28 and 42 °C, with the crystal violet method and they were classified as high, moderate and low biofilm forming. Additionally, the presence of the *pls* operon was demonstrated, associated with biofilm formation. Finally, the existing clonality was determined by ERIC-PCR. It was determined that 70% of the strains formed biofilm, 24.3% were high biofilm formers, 35.1% moderate, 10.8% were low formers and 30% did not form biofilm, in addition, it was shown that at 4 °C the formation of biofilm was favored. The *plsA* genes were detected in 8/26 of the strains, the *plsB* gene in 0/26 and the *plsD* gene in 1/26. Based on the results, it was concluded that the biofilm formation in the studied strains was temperature and strain dependent, and that the biofilm formation does not depend of the *pls* cluster presence, furthermore, genetic diversity between the strains was not demonstrated by ERIC-PCR.

Keywords: *Aeromonas*, food, biofilm

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son la causa principal de trastornos del tubo digestivo, dolores abdominales, diarrea y vómito. Los factores que ocasionan ETA, con base en lo descrito por Bravo en el 2004, son el calentar, el cocinar o mantener los alimentos incorrectamente, el no conservar la cadena fría de los alimentos, las personas portadoras con malos hábitos higiénicos, la deficiente desinfección de estos y la contaminación cruzada de alimentos crudos y los alimentos cocidos (Casañ *et al.*, 2017).

Las ETA son causadas por gran número de agentes, entre los que destacan los de tipo microbiológico. Algunas de las bacterias patógenas asociadas a ETA son *Salmonella* spp., principalmente las serovariedades Typhi y Paratyphi, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Vibrio* spp., y *Escherichia coli*, entre otras, sin embargo, algunos agentes etiológicos causantes de estas infecciones, pero que están subestimados como causantes de estas, no se buscan de forma habitual en el laboratorio en muestras diarreicas, como es el caso del género *Aeromonas*, que ha sido aislado de muestras de alimentos y que se considera un patógeno potencial de enfermedades en humanos, tanto a nivel intestinal como extraintestinal (Soto-Varela *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Newell *et al.*, 2017).

El género *Aeromonas*, se conforma de bacterias gramnegativas, pertenecientes a la familia *Aeromonadaceae*. Son bacilos cortos (0.3 a 1.0 x 1.0 a 3.5 μ m) anaerobios facultativos, son positivas a las pruebas de oxidasa y catalasa, reducen el nitrato a nitrito son capaces de fermentar la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía, pueden desarrollarse en medios hasta con 3 % de NaCl (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002).

Las especies de *Aeromonas* son autóctonas de ambientes acuáticos, se consideran de importancia sanitaria, dado que han logrado aislarse de aguas potables cloradas y no cloradas, agua embotellada y tuberías de agua, lo anterior, podría estar relacionado a su capacidad de formar biopelícula, sin embargo, esto no está relacionado directamente con el origen se describen procesos infecciosos en heridas que han tenido contacto con agua contaminada (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Villari *et al.*, 2003).

Por lo anterior en esta investigación se propuso evaluar la formación de biopelícula de cepas de *Aeromonas* spp., aisladas de carne de pollo a 4, 28 y 42 °C durante 72 h, así

como la detección de los genes homólogos al clúster *pls* por PCR y la determinación de la diversidad genética entre las cepas de estudio por la técnica de ERIC-PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente investigación se trabajó con 37 cepas de *Aeromonas* aisladas de carne de pollo procedentes de diferentes localidades de la Ciudad de México. Se realizó el análisis de la capacidad de formación de biopelícula a 4, 28 y 42 °C, por el método de cristal violeta. Con base en lo establecido por Stepanovic y colaboradores en el 2004. La densidad óptica de corte (ODc) se define como la densidad óptica promedio. Mientras que la densidad óptica es proporcional a la cantidad de cristal violeta absorbido el cual a su vez es directamente proporcional a la formación de biopelícula. Se estableció el ODc como tres desviaciones estándar por encima de la OD media del control negativo. Por lo tanto, $OD \leq ODc$ significa no formadora de biopelícula, $ODc < OD \leq (2 \times ODc)$ se interpreta como baja formadora de biopelícula, $(2 \times ODc) < OD \leq (4 \times ODc)$ se considera una cepa moderada formadora de biopelícula y $(4 \times ODc) < OD$ significa alta formadora de biopelícula.

Adicionalmente se demostró la presencia del operón *pls*, asociando los genes *plsA*, *plsB* y *plsD* que codifican para la formación de biopelícula, mediante PCR punto final bajo las condiciones que se presentan en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Mezcla de reacción para las PCR

Reactivo	Concentración	Volumen (μ L)
Agua	-	28
Regulador de PCR	10 X	5
DNTP's	2 mM	7.5
MgCl ₂	50 mM	1.8
Iniciadores	0.3 μ M	1 μ L de cada uno
Taq polimerasa	5 U	0.5
DNA	-	5
Volumen final	-	50

Modificado de: Luna-Rico, 2011.

Cuadro 2. Condiciones de amplificación para la realización de las PCR

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineamiento	60	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1

Modificado de: Luna-Rico, 2011.

Finalmente, la determinación de la diversidad genética se realizó analizando las fotos de los geles de poliacrilamida, obtenidos mediante la técnica ERIC-PCR. Las secuencias ERIC constituyen una clase de elementos repetitivos de DNA de 126-127 pb que contienen una repetición invertida central, altamente conservada del genoma bacteriano que pueden ser amplificados por PCR, esto se realizó con la finalidad de conocer la diversidad de las cepas de *Aeromonas* de estudio, los iniciadores para la reacción fueron los reportado por Versalovic y colaboradores, 1991. Los geles de poliacrilamida obtenidos mediante la técnica ERIC-PCR, fueron analizados con el programa bioinformático BioNumerics 5.1.

La mezcla de reacción y las condiciones de reacción utilizadas para los ERIC-PCR, fueron las propuestas por Castro-Escarpulli en 2003 y Pelcastre-Rodríguez en el 2019 (cuadros 3 y 4).

Cuadro 3. Mezcla de reacción para ERIC-PCR

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)
Regulador PCR	10 X	5.0
dNTP's	2 mM	7.5
MgCl ₂	50 mM	3.0
Iniciador ERIC 1	0.1 µM	1.0
Iniciador ERIC 2	0.1 µM	1.0
Taq polimerasa	5 U/µL	0.5
H ₂ O desionizada	-	30
DNA	50 ng/µL	2.0

Tomado de: Pelcastre-Rodríguez, 2019

Cuadro 4. Condiciones de reacción para ERIC-PCR


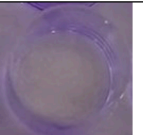
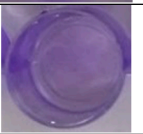

Número de ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Desnaturalización inicial	94	1
30	Desnaturalización	94	1
	Alineamiento	52	1
	Extensión	65	8
1	Extensión final	65	16

Tomado de: Pelcastre-Rodríguez, 2019

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en lo establecido por Stepanovic y colaboradores en el 2004. La densidad óptica de corte (OD_c) se define como la densidad óptica promedio. Mientras que la densidad óptica es proporcional a la cantidad de cristal violeta absorbido el cual a su vez es directamente proporcional a la formación de biopelícula. Se establecieron las clasificaciones de formación de biopelícula tomando en cuenta las siguientes condiciones; se estableció el OD_c como tres desviaciones estándar por encima de la OD media del control negativo. Por lo tanto, OD ≤ OD_c significa no formadora de biopelícula, OD_c < OD ≤ (2 × OD_c) se interpreta como baja formadora de biopelícula, (2 × OD_c) < OD ≤ (4 × OD_c) se considera una cepa moderada formadora de biopelícula y (4 × OD_c) < OD significa alta formadora de biopelícula, para medir la cantidad de biopelícula formada bajo las diferentes condiciones probadas, se asignaron unidades de absorbancia media a 570 nm (Cuadro 5).

Cuadro 5. Criterio de formación de biopelícula de *Aeromonas* spp.

Clasificación	Absorbancia	Tinción
No formadora de biopelícula	< 0.106	
Baja formadora de biopelícula	0.106 < 0.158	
Mediana formadora de biopelícula	0.158 < 0.209	
Alta formadora de biopelícula	> 0.209	

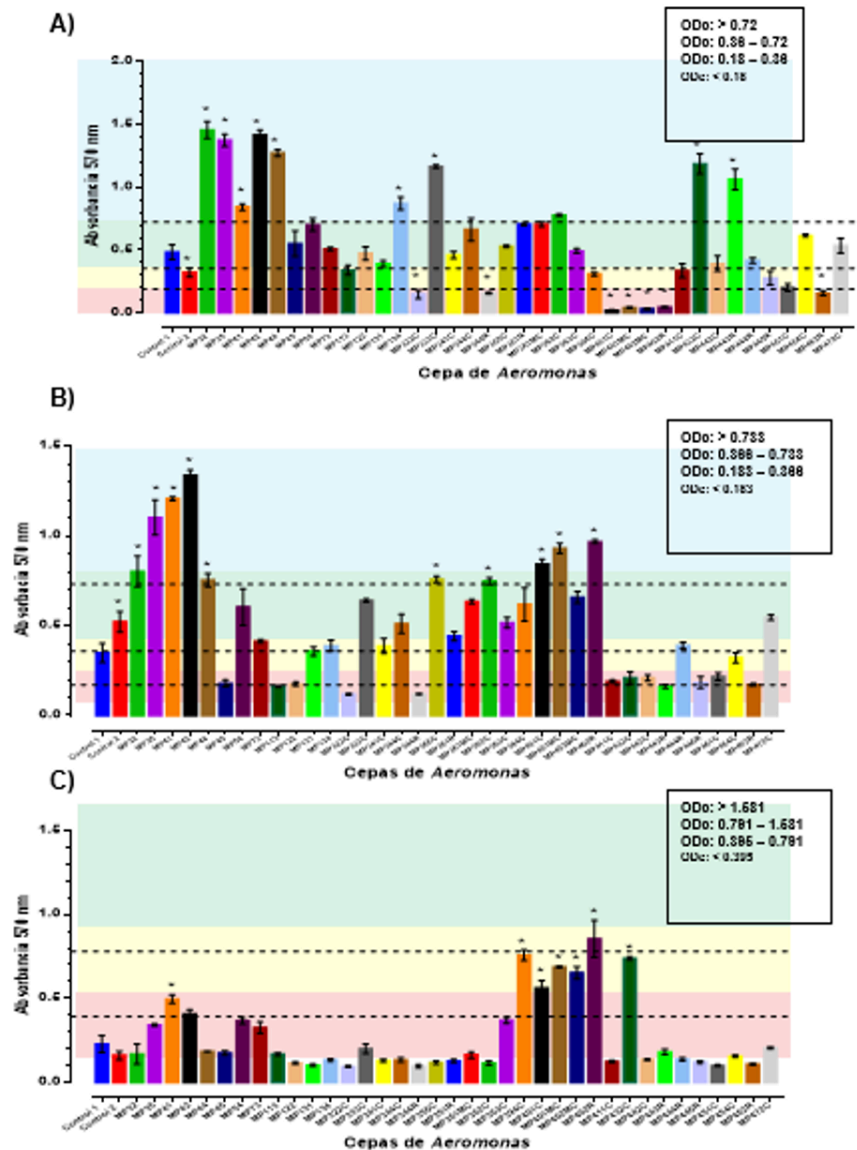


Figura 1. Formación de biopelícula por cepas de *Aeromonas* spp., bajo diferentes temperaturas de incubación. A) 4 °C, B) 28 °C y C) 42 °C durante 72 h. Control 1 corresponde a la cepa *A. caviae* Sch3, el control 2 corresponde con la cepa *A. hydrophila* ATCC 7966^T. En las gráficas se muestra con “*” aquellas cepas en las que existe diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

Se demostró que el 70 % de las cepas analizadas, eran formadoras de biopelícula, de las 37 cepas el 24.3 % fueron altas formadoras, el 35.1 % moderadas formadoras, el 10.8 % fueron bajas formadoras y el 30 % no formadoras de biopelícula. Por otro lado, se realizó el análisis estadístico con ANOVA comparando los niveles de formación de biopelícula de las cepas problema aisladas de carne de pollo contra las cepas *A. caviae* Sch3 (control 1) y *A. hydrophila* ATCC 7966^T (control 2). Cuando el valor de $z \geq 1.96$ ($P < 0.05$), existía diferencias estadísticamente significativas (figura 2).

En el presente trabajo se consideró la posibilidad de que las condiciones ambientales en el almacenamiento de

carne de aves, para su comercio, influyen en la formación de biopelícula, dichas condiciones están dictadas en la normativa actual (NOM-145-SSA1-1995), que estipula 4 °C, como la temperatura máxima adecuada para la conservación de carnes para consumo humano, mientras que la temperatura corporal de las aves de corral es de aproximadamente 42 °C. Con los resultados se infiere que las cepas que forman biopelícula a 42 °C pueden ser responsables de contaminación de origen. Mientras que las cepas que forman biopelícula a 4 °C podrían estar más estrechamente relacionadas con los métodos de conservación de la carne de pollo, por el constante uso de hielo que probablemente estuviera contaminado, derivado de esto, se considera que las cepas de *Aeromonas*

spp., son capaces de formar biopelícula a 4 y 42 °C, de tal forma que la temperatura de almacenamiento de la carne de aves podría ser un factor que propicia el desarrollo bacteriano, sumado a la capacidad de desarrollar y formar biopelícula a la temperatura corporal del pollo en crianza, lo anterior convierte a la carne de pollo en un riesgo para la salud del consumidor (Castro-Escarpulli *et al*, 2002; Angeles-Morales, 2009; Gonzalez-Avila, 2018).

La formación de biopelícula de las cepas en cada temperatura y los valores de OD permitieron clasificarlas como no formadoras, bajas, medianas o altas formadoras de biopelícula se muestran en el cuadro 6.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que algunas cepas presentan un comportamiento distinto al de los grupos control formando menor cantidad de biopelícula a bajas temperaturas. Esto hace énfasis en la adaptabilidad que tienen las cepas en el entorno en el que se encuentran. Por lo que se estima que la formación de biopelícula es dependiente de la cepa tanto como lo es de la temperatura (Igbinsosa *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2018; Çam & Brinkmeyer, 2019).

Así mismo, se detectó en 8/37 el gen *plsA*, el gen *plsB* en 0/37 de las cepas y el gen *plsD* en 1/37 de las cepas (figura 2). Los resultados obtenidos de las cepas estudiadas tuvieron concordancia con lo determinado por Luna-Rico en el 2011, en el cual se detectó en algunas de las cepas de *Aeromonas* spp., podían formar biopelícula y a su vez presentar incompleto o no presentar ninguna de las fracciones que componen al clúster *pls*.

Los resultados de este trabajo determinaron que únicamente el 37 % de las cepas estudiadas presentaron una de las tres partes que conforman al clúster *pls* y que de este 37 % ninguna de las cepas presentó el clúster de forma completa, siendo que en su totalidad las cepas son formadoras de biopelícula en diferentes grados por lo que podría ser que la presencia o ausencia del clúster *pls* en las cepas de *Aeromonas* spp., no es un factor determinante en la formación de biopelícula. Con este estudio se podría sugerir que la capacidad de formar biopelícula es una cualidad propia de la cepa y no especie dependiente. Así mismo se ha descrito que los exopolisacáridos que componen las biopelículas, guardan relación en algunas bacterias con la presencia de genes constitutivos que regulan la formación de esta o la producción de compuestos que la estabilizan. Esto se ha descrito en *Pseudomonas aeruginosa*, la cual cuenta con regiones génicas *pls*. (Zhuoren *et al*, 2017).

Cuadro 6. Clasificación de las cepas formadoras de biopelículas con base en la temperatura

	28 °C		4 °C		42 °C	
	# Cepas	Porcentaje %	# Cepas	Porcentaje %	# Cepas	Porcentaje %
No formadora de biopelícula	11	29.73	7	18.92	25	67.57
Baja formadora de biopelícula	4	10.81	5	13.51	5	13.51
Mediana formadora de biopelícula	13	35.14	15	40.54	7	18.92
Alta formadora de biopelícula	9	24.32	10	27.03	0	0.00

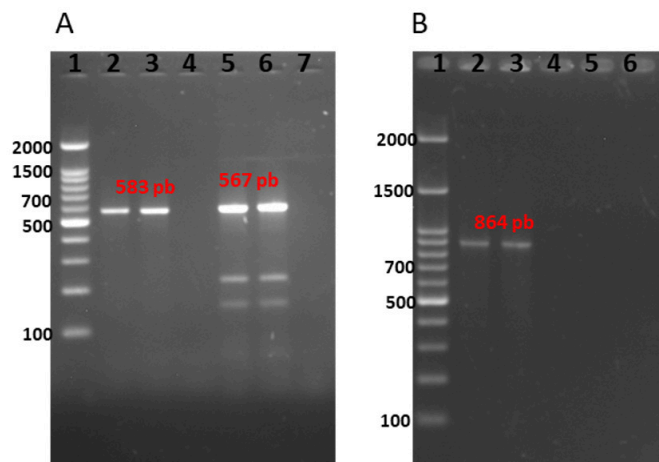


Figura 2. Electroferograma de los productos amplificados por PCR de los genes homólogos a *plsA*, *plsB* y *plsD*. A) Amplificación del gen *plsA* y *plsD*. Carril 1.- Marcador de talla molecular (PCR Ladder Track it®). Carril 2.- *plsA* 583 pb, carril 3.- *plsA* 583 pb (duplicado), carril 4.- Control negativo *plsA*, carril 5.- *plsD* 567 pb, carril 6.- *plsD* 567 pb (duplicado) y carril 7.- control negativo *plsD*. B) Amplificación del gen *plsB*. Carril 1.- Marcador de peso molecular (PCR Ladder). Carril 2.- *plsB* 864 pb, carril 3.- *plsB* 864 pb (duplicado) y carril 4.- Control negativo *plsB*.

Con base en la tipificación por ERIC-PCR en la figura 3 se muestra un ejemplo de los patrones de bandeo de 8 de las 37 cepas probadas. En este análisis, se hace evidente que las cepas de trabajo, si bien guardan cierta cercanía, no presentan clonalidad entre ellas. Este resultado refleja la ausencia de una cepa predominante como contaminante en la carne de pollo que se consume en la Ciudad de México. A su vez, también hace referencia a la inmensurable cantidad de cepas circulantes del género *Aeromonas* que pueden encontrarse contaminando la carne de pollo, en México no existe registro de alguna investigación en la que se evalúe el comportamiento de cepas de *Aeromonas* spp., aisladas de este tipo de carne.

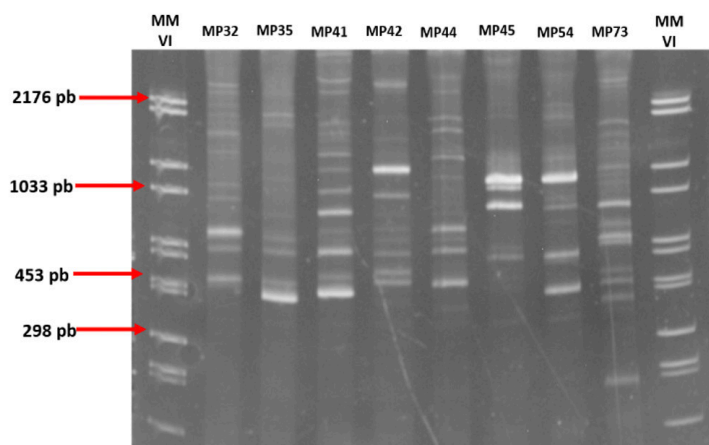


Figura 3. Electroferograma de los productos de amplificación por ERIC-PCR. Perfil electroforético de 8 de las cepas de *Aeromonas* spp., aisladas de carne de pollo. En los carriles marcados con MMVI se encuentra el marcador de talla molecular (Marker VI Roche). En los carriles centrales marcados con MP se encuentran las cepas de trabajo.

Se utilizó el coeficiente de correlación de Jaccard y el algoritmo de agrupación de promedio matemático del grupo de pares no ponderado (UPGMA) y se elaboró el dendrograma de similitud (figura 4). En el 2017, Zhuoren y colaboradores aislaron diferentes cepas de *Aeromonas* de carne de pollo en diferentes locales comerciales en Beijing China, en donde se identificaron especies como *A. veronii*, *A. caviae*, y *A. hydrophila*, convendría realizar el estudio a profundidad en México para comparar con otros estudios y determinar las especies que son aisladas de muestras de carne de pollo, así como la determinación de los factores putativos de virulencia que podrían poseer, esto se considera importante dado que, las cepas aisladas de alimentos, que tengan microorganismos causantes de infecciones, con potenciales factores putativos de virulencia y/o mecanismos de patogenicidad, representan un riesgo para los consumidores de estos alimentos mal cocidos, o que se consumen en condiciones insalubres (Zhuoren *et al*, 2017).

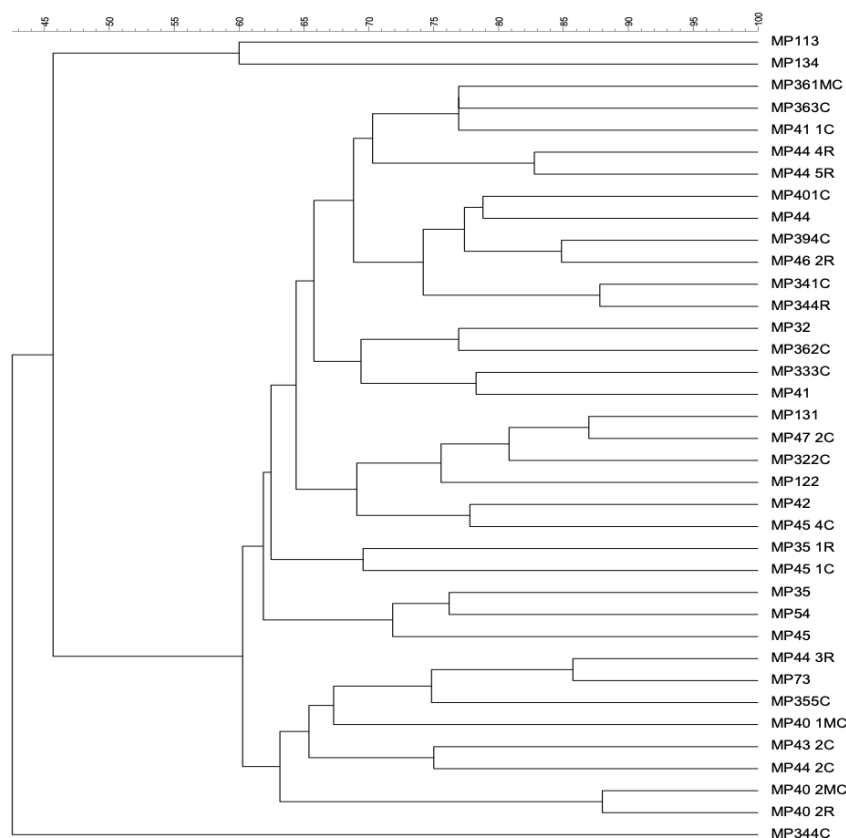


Figura 4. Relación genética de las cepas de *Aeromonas* spp., aisladas de carne de pollo. A partir de la información obtenida por las secuencias ERIC se generó un dendrograma para visualizar la relación genética de las cepas. Análisis bioinformático realizado mediante el índice de Jaccard, con el programa BioNumerics 5.1 con un coeficiente de correlación 0.7.

En este análisis, se hace evidente que las cepas de trabajo, si bien guardan cierta cercanía, no presentan clonalidad entre ellas. Este resultado refleja la ausencia de una cepa predominante como contaminante en la carne de pollo que se consume en la Ciudad de México. A su vez, también hace referencia a la inmensurable cantidad de cepas circulantes del género *Aeromonas* que pueden encontrarse contaminando la carne de pollo, en México no existe registro de alguna investigación en la que se evalúe el comportamiento de cepas de *Aeromonas* spp., aisladas de este tipo de carne.

CONCLUSIÓN

La formación de biopelícula se favoreció a 4 °C y es temperatura y cepa dependiente además de ser independiente de la presencia del clúster *pls*. Demostrando que no existió clonalidad entre ellas.

Declaración de conflicto de interés: Los autores de este trabajo declaran que no hay conflictos de interés.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo formó parte de Proyecto Sistema CRISPR-Cas una nueva alternativa de identificación bacteriana (SIP 2021351) apoyado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Graciela Castro- Escarpulli recibe becas de Estímulos al Desempeño de los Investigadores Investigación, Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (Instituto Politécnico Nacional), Cecilia Hernández-Cortez y Graciela Castro- Escarpulli reciben beca del Sistema Nacional de Investigadores (SNI, CONACyT). Luis Uriel Gonzalez-Avila reciben beca de CONACYT y del Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN)

REFERENCIAS

- Angeles-Morales EB, Mondragón-Flores R, Luna-Arias JP, Enríquez-Nieto CT, Parra-Ortega B & Castro-Escarpulli G. Evaluation of Morphological Changes of *Aeromonas caviae* Sch3 Biofilm Formation under Optimal Conditions. *Ai Magazine*, 2012; 2:552-560.
- Angeles-Morales EB. El quorum sensing en la formación de biopelícula y movilidad tipo swarming en cepas de *Aeromonas* spp. (Tesis de Maestría). México D.F.: IPN, ENCB, 2009.
- Bravo-Martínez F. El manejo higiénico de los alimentos. 2da edición. Editorial Limusa. México, D.F. 2004.
- Çam S, & Brinkmeyer R. The effects of temperature, pH, and iron on biofilm formation by clinical versus environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Czech Republic: Institute of Microbiology*, 2019; 65(3), s12223-019-00761-9. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00761-9>
- Casañ C, Ocete MD, Medina R & Gimeno C. Evaluation of the Luminex xTAG®-GPP (Gastrointestinal Pathogen Panel) in the diagnosis of diseases with acute diarrhoea. Evaluación del panel gastrointestinal xTAG®-GPP de Luminex en el diagnóstico de las gastroenteritis agudas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2017; 35(9), 574-577. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.022>
- Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Giono-Cerezo S, Hernandez-Rodriguez CH, Chacón M. R, Falgás LS & Figueras-Salvat MJ. El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 2002; 22(4), 206-216.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, & Chacón MR. Characterisation of *Aeromonas* spp., isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 2003; 84(1), 41-49. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00393-8)
- Dias C, Borges A, Saavedra MJ, & Simões M. Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2018; 12, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.09.010>
- Gonzalez-Avila LU. Detección convencional y molecular de *Aeromonas* spp., en carne de pollo. (Tesis de Maestría). México, CDMX: IPN, ENCB, 2018.
- Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, & Okoh AI. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, 2012; 625023. <https://doi.org/10.1100/2012/625023>
- Luna-Rico A. Búsqueda de genes homólogos al clúster *pls* y *Pel* de *Pseudomonas aeruginosa* en cepas de *Aeromonas* spp., formadoras de biopelículas. (Tesis de Licenciatura). México D.F.: IPN, ENCB, 2011.
- Newell DG, Manning G, Goldberg M, Morgan D & Wassenaar TM. The Influence of Virulence Factors on Dose Response of Food-Borne Pathogens. *Foodborne Pathogens*, 2017; 531-552. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56836-2_19
- Pelcastre-Rodríguez L. Identificación de *Aeromonas* spp., en un hospital de tercer nivel. (Tesis de Maestría). México CDMX: IPN, ENCB, 2019.
- Soto-Varela Z, Pérez-Lavalle L & Estrada-Alvarado D. Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at Colombia. *Colombia: Salud Uninorte*, 2015; 32 (1). 0120-5552. <http://dx.doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
- Stepanović S, Ćirković I, Ranin L & Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in applied microbiology*, 2004; 38(5), 428-432. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>
- Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, & Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in applied microbiology*, 2004; 38(5), 428-432.
- Versalovic J, Koeuth T & Lupski J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 1991; 19(24), 6823-6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Villari P, Crispino M, Montuori P & Boccia S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003; 69(1), 697-701. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.697-701.2003>
- Zhao Y, Wang H, Zhang P, Sun C, Wang X, Wang X, Yang R, Wang C & Zhou L. Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay. *Scientific Reports*, 2016; 6, 21342. <https://doi.org/10.1038/srep21342>

Cuerpo académico UJE- CA- 134 Química y Tecnología de Productos Alimenticios

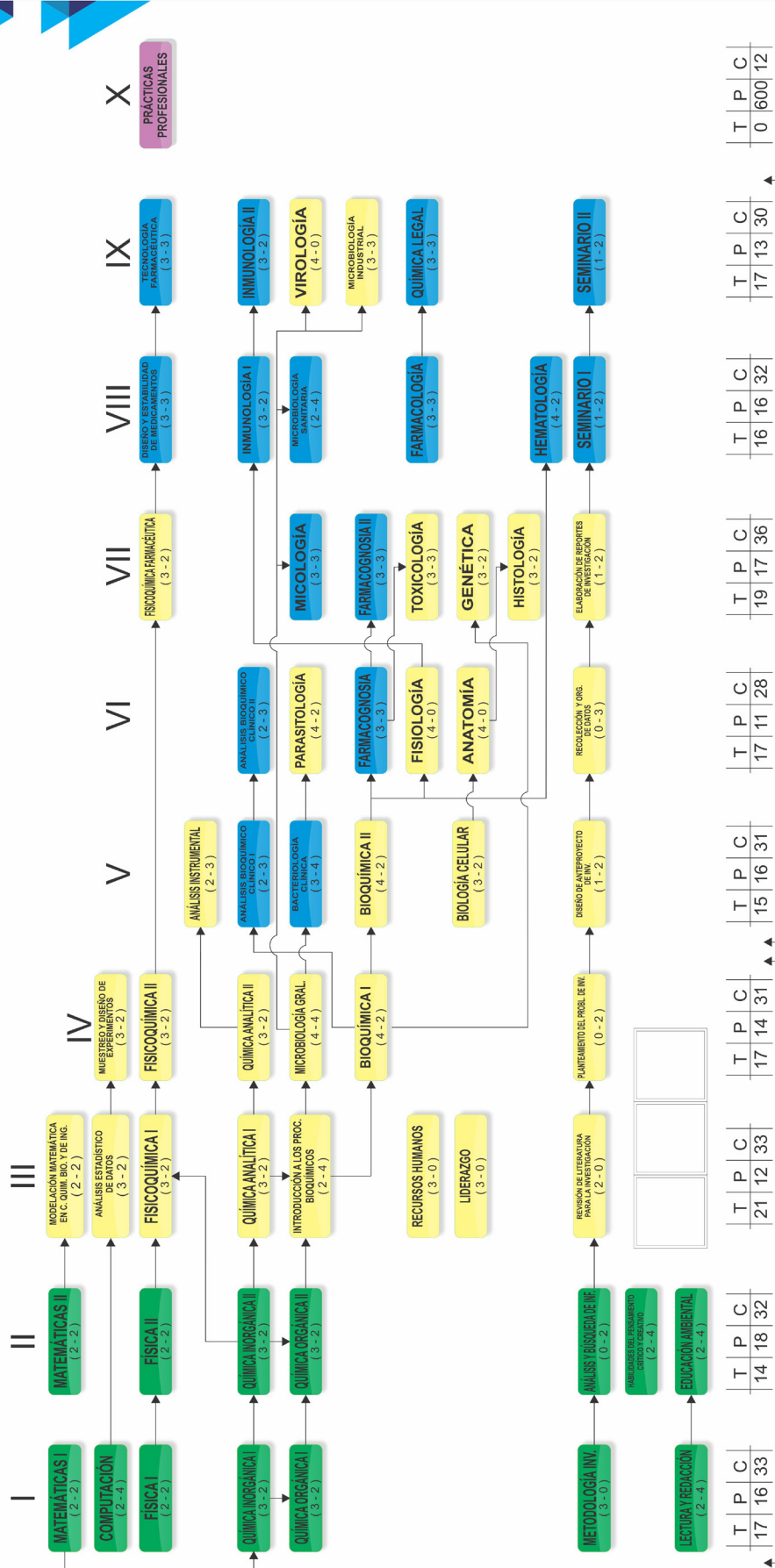
LGAC: Tecnología de Alimentos y sus biocomponentes

Nombre proyecto	Investigador responsable	
Contenido de licopeno en tomate orgánico y con fertilización química.	Guadalupe Candelas Cadillo	
PROPIEDADES FUNCIONALES Y DE TEXTURA DE SÁBILA (<i>Aloe vera barbadensis</i> Miller) FRESCA Y PROCESADA.		
Extracción de biocomponentes de diferentes matrices alimentarias aplicando ultrasonido de potencia	José Rafael Minjares Fuentes	
Aplicación de ultrasonidos de potencia al gel de Aloe vera		Juan José Martínez García
Efecto de la temperatura y la velocidad de alimentación del secado por aspersión en las propiedades funcionales, la concentración de aloemodina y aloína, la actividad antioxidante y el perfil de carbohidratos del jugo de gel de <i>Aloe barbadensis</i> Miller	Víctor Manuel Rodríguez González	
Construcción de un extractor sólido – líquido didáctico	Juan Pablo Alemán Morán	
Textura, nivel de agrado y vida de anaquel de un mazapán de nuez (<i>Carya illinoensis</i>) adicionado con diferentes concentraciones de inulina y leche en polvo		



QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MAPA CURRICULAR



2 OPTATIVAS DE CARRERA DE V A IX

T P C
6 0 6

2 OPTATIVAS DE CARRERA DE I A IV

T P C
6 0 6

FORMACIÓN INTEGRAL

FORMACIÓN CULTURAL Y DEPORTE

FORMACIÓN INTELLECTUAL

FORMACIÓN SOCIAL

FORMACIÓN PROFESIONAL

FORMACIÓN TRANSVERSAL

8 CREDITOS

10 CREDITOS

12 CREDITOS

4 CREDITOS



REMDIS (fcqgp.ujed.mx/remdis)

ISSN: 2594-1445

Publicación Semestral de Investigación Científica en
Ciencias Alimentarias y de Salud.

Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio
Universidad Juárez del Estado de Durango

www.ujed.mx

Artículo 123 S/N Col. Filadelfia, Gómez Palacio,
Durango, México CP 35010

Telefono (871) 715 8810 ext. 224

e-mail: editorremdis@gmail.com