

Artículo original

Características genéticas de *Klebsiella* spp. resistente a los antibióticos y biocidas obtenidas de leche de vaca

Pedro Damián Loeza Lara, Ricardo Iván Medina Estrada, Santos Carballar Hernández, Rafael Jiménez Mejía*

Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del estado de Michoacán de Ocampo, Michoacán, México.

Recibido 7 de julio de 2022; aceptado 7 de noviembre de 2022

Resumen: Las especies del género *Klebsiella* son patógenos oportunistas causantes de infecciones extraintestinales e intestinales en humanos, capaces de expresar diversos factores de virulencia, así como de formar biopelículas. Además, presentan diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos. En este trabajo, se estudió la resistencia a antibióticos y biocidas de *Klebsiella* spp. aisladas de leche de vaca, así como la diversidad genética y frecuencia de genes de virulencia. Del total de bacterias aisladas, 26 fueron gramnegativas y 20 fueron clasificadas como *K. pneumoniae* mediante análisis molecular. El 85% de las *K. pneumoniae* fueron multiresistentes a los antibióticos y resistentes a los biocidas. Además, el 95% fue formador de biopelículas. La similitud genética entre las *K. pneumoniae* fue mayor al 78%. En el 90% se determinó la formación de biopelículas y se detectaron uno o más genes asociados con virulencia, destacando un grupo de cinco con un mismo perfil de seis genes de virulencia. Los datos obtenidos indican que la leche de vaca en el área de estudio representa un riesgo a la salud de los consumidores por la presencia de *K. pneumoniae* potencialmente patógenas y resistentes a antibióticos y desinfectantes.

Palabras clave: *Klebsiella* spp.; *Klebsiella pneumoniae*; resistencia a los antibióticos; desinfectantes; relación genética; genes de virulencia.

Genetic characteristics of *Klebsiella* spp. resistant to antibiotics and biocides obtained from cow milk

Abstract: *Klebsiella* species are opportunistic pathogens causing extraintestinal and intestinal infections in humans, capable of expressing several virulence factors, as well as forming biofilms. In addition, they have several antibiotics resistance mechanisms. In this work, the antibiotic and biocide resistance of *Klebsiella* spp. isolated from cow's milk, as well as genetic diversity and frequency of virulence genes were studied. Of the total bacteria isolated, 26 were Gram-negative and 20 were classified as *K. pneumoniae* by molecular analysis. Eighty-five percent (85.5%) of *K. pneumoniae* were multiresistant to antibiotics and resistant to biocides. In addition, 95% were biofilm formers. Genetic similarity between *K. pneumoniae* was greater than 78%. Biofilm's formation was determined in 90% and one or more associated virulence genes were detected, highlighting a group of five with the same profile of six virulence genes. The data indicates that cow's milk represents a risk to the consumers health in the study area, due to the presence of *K. pneumoniae* potentially pathogenic and resistant to antibiotics and disinfectants.

Keywords: *Klebsiella* spp.; *Klebsiella pneumoniae*; antibiotics resistance; biocides; genetic relationship; virulence genes.

* Correspondencia:

E-mail: rjimenez@ucemich.edu.mx

Introducción

Klebsiella pneumoniae es una bacteria gramnegativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, ubicada en agua, suelo y animales. Recientemente, mediante estudios genómicos, se ha observado que la mayoría de las *K. pneumoniae* identificadas por métodos bioquímicos o moleculares tradicionales pertenecen a un grupo de especies muy relacionadas genética y fisiológicamente, denominado

complejo de especies *K. pneumoniae* (ECKp), que incluye a *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae*, *K. variicola*, *K. quasivariicola* y *K. africana* [1]. De las anteriores, *K. pneumoniae* es la especie más frecuente y a la que mejor se le han descrito sus características. Es un patógeno oportunista de humanos, que se asocia principalmente con infecciones extraintestinales adquiridas en ambientes hospitalarios [2,3]. Frecuentemente se encuentra en diversos alimentos, por lo que se le considera un patógeno transmitido por

alimentos asociado con brotes de infecciones diarreicas en humanos [4,5]. Los principales factores implicados en la virulencia de *K. pneumoniae* incluyen la cápsula, endotoxinas, sideróforos, sistemas de adquisición de hierro y adhesinas [5]. Además, se ha descrito que la formación de biopelículas es un factor de virulencia importante, debido a que las protege de la eliminación por el sistema inmune del hospedero y del efecto de los antibióticos; se ha descrito que la formación de biopelículas está asociada con la presencia de ciertos factores de virulencia [6].

K. pneumoniae es un patógeno importante por la frecuencia y diversidad de mecanismos de resistencia a los antibióticos que posee, los cuales pueden ser transferidos a otras bacterias. Con el propósito de controlar la diseminación de bacterias causantes de infecciones, se ha recurrido al uso de diversos desinfectantes y antisépticos, en el ambiente hospitalario, en la industria alimentaria y en productos de uso personal [7,8]. Sin embargo, la creciente tolerancia bacteriana a esos compuestos biocidas ha causado preocupación en los últimos años, debido a que frecuentemente los mecanismos de resistencia pueden ser los mismos que para los antibióticos, por lo cual, se ha sugerido que el uso excesivo de esos compuestos favorece la selección de bacterias resistentes a biocidas y antibióticos [9].

En la industria lechera, *Klebsiella* spp. es causa frecuente de mastitis bovina ambiental, por lo que puede encontrarse en la leche afectando su calidad microbiológica, además de representar un riesgo a la salud de los consumidores. Sin embargo, en la literatura no hay estudios que analicen el riesgo potencial del consumo de leche de vaca sin pasteurizar contaminada con estas especies bacterianas. En el occidente de Michoacán, se encuentra la principal cuenca lechera del estado. La industria láctea es la segunda actividad económica de la región, por lo que de ella depende gran parte de la población. Sin embargo, al igual que cualquier otra zona productora de leche, en ésta se presentan diversas problemáticas, entre ellas la mastitis bovina, causada por bacterias gramnegativas potencialmente patógenas que pueden contaminar la leche y sus derivados [10]. Por esto, el propósito de este trabajo fue estudiar las características genéticas, de resistencia a antibióticos y biocidas de *Klebsiella* spp. aisladas de leche de vaca de hatos del occidente de Michoacán, México.

Materiales y métodos

Recolección de muestras y aislamiento de bacterias: A partir de contenedores de leche de acero inoxidable de 20 L, de dos establos ubicados en el municipio de Sahuayo, Michoacán, se recolectaron 10 muestras de 500 mL de leche entre agosto de 2016 y febrero de 2017. Para aislar bacterias resistentes a los antibióticos se tomaron 100 µL de cada muestra y se sembraron directamente en cajas de Petri con agar nutritivo suplementado con antibióticos pertenecientes a cuatro familias distintas y de uso común en ganado bovino. Los antibióticos y concentraciones usadas

fueron ampicilina 32 µg/mL, cloranfenicol 32 µg/mL, estreptomina 32 µg/mL y tetraciclina 16 µg/mL (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA). De las cajas en que se obtuvo crecimiento se seleccionaron al azar dos colonias para su posterior análisis; en total se obtuvieron 50 aislados bacterianos.

Identificación bioquímica y molecular: A las bacterias aisladas se les realizó tinción de Gram y las gramnegativas se sembraron en agar MacConkey (BD Difco). A partir de este medio de cultivo se seleccionaron los aislados fermentadores de lactosa y con fenotipo mucosoide semejante al de *K. pneumoniae* ATCC 700603, las cuales se sembraron en agar citrato de Simmons (BD Difco) y agar citrato con 1% de inositol (Sigma-Aldrich). La identidad de las bacterias se confirmó a nivel molecular mediante la amplificación por PCR del fragmento ITS (16S–23S rDNA internal transcribed spacer) específico de *K. pneumoniae* con los oligonucleótidos Pf y Pr1 en las condiciones previamente descritas por Liu Y *et al.* [11]. Como control positivo se utilizó *K. pneumoniae* ATCC 700603 y como controles negativos *E. coli* ATCC 25922 y mezcla de reacción sin DNA.

Resistencia a antibióticos y desinfectantes: Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos y desinfectantes se realizaron mediante ensayos de dilución en agar Müeller-Hinton (BD Difco) siguiendo las recomendaciones del CLSI y criterios definidos en la literatura [12,13]. Para realizar lo anterior, las bacterias se sembraron en 2 mL de caldo Müeller-Hinton y se incubaron a 37 °C por 20 h. Posteriormente se diluyeron en el mismo medio hasta igualar la turbidez al tubo 0,5 de la escala de McFarland (1x10⁸ UFC/mL). De cada dilución se depositaron aproximadamente 2 µL sobre la superficie de agar Müeller-Hinton con el antibiótico y la concentración deseada. Los antibióticos (Sigma-Aldrich) analizados fueron: ampicilina, gentamicina, tetraciclina, estreptomina, kanamicina, ciprofloxacina, carbenicilina, ceftazidima, cefotaxima, cloranfenicol, meropenem y cefixima. Las concentraciones probadas fueron de 0,125 a 1.024 µg/mL. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue aquella a la que no se observó crecimiento sobre la superficie del agar. Además, con los datos obtenidos, las bacterias se clasificaron como resistentes o susceptibles de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI [12]. El experimento se realizó al menos dos veces de forma independiente y como cepa de referencia se utilizó *K. pneumoniae* ATCC 700603.

De igual forma que para los ensayos de resistencia a antibióticos, se determinó la CMI para los desinfectantes cloruro de benzalconio (Cbe), triclosán (Tri), bromuro de cetiltrimetilamonio (Ctab), Glutaraldehído (Gta) y digluconato de clorhexidina (Chx) (Sigma-Aldrich), mediante dilución en agar Müeller-Hinton [13]. Las concentraciones que se probaron fueron de 0,125 a 1.024 µg/mL. La CMI se determinó como aquella a la que no se observó crecimiento visible sobre la superficie del

agar. Siguiendo los criterios descritos en la literatura, las bacterias se clasificaron como resistentes o susceptibles a esos compuestos [13,14].

Formación de biopelículas: La formación de biopelículas se analizó en placas de Elisa de 96 pozos como se ha descrito en la literatura [15]. Se incubaron cultivos bacterianos toda la noche en caldo Luria Bertani (LB) a 37 °C. Al día siguiente, 10 µL del cultivo se inocularon en 1 mL de caldo LB y se depositaron 200 µL por cuadruplicado en placas de Elisa de poliestireno de 96 pozos (Kartell). Las placas se incubaron a 30 °C en estático por 18 h, posteriormente se descartó el líquido y la placa se lavó tres veces con 200 µL de solución salina (SS). Después, se adicionaron 200 µL de cristal violeta al 1%, se dejó por 20 min, se descartó el colorante y la placa se lavó 4 veces con SS y agitación vigorosa. El colorante retenido en cada pozo se solubilizó con etanol al 70% y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer). El experimento se repitió tres veces por cuadruplicado.

Con los datos obtenidos se calculó el promedio de la densidad óptica (DO). De igual forma se calculó la densidad óptica de corte (DOc), para lo cual se tomó como base el promedio de la DO del control negativo más tres veces su desviación estándar, obteniéndose un valor de 0,11. La clasificación de las bacterias formadoras de biopelículas se realizó de la siguiente manera: formadoras fuertes (F) $DO > 4 \times DOc$, moderadas (M) $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$, débiles (D) $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ y negativas (N) $DO \leq DOc$ [16].

Diversidad genética: El análisis de diversidad genética se realizó mediante ERIC-PCR con los oligonucleótidos ERIC1R y ERIC2 [17] como se describe a continuación. Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µL conteniendo PCR Master mix 1X (Promega), 1 µM de cada primer y 50 ng de ADN aproximadamente. Las condiciones que se utilizaron para la amplificación fueron las descritas previamente [5]. Los productos obtenidos se separaron por 2 h a 90 V en geles de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador Universal Hood II (Bio-Rad).

Los patrones de bandas obtenidos en los geles se analizaron con el software GelJ versión 2 [18]. El tamaño de las bandas fue normalizado en los diferentes geles usando como estándar de referencia el marcador de 1 Kb DNA ladder (Promega), que tiene fragmentos entre 250 y 10.000 pb. Los coeficientes de similitud fueron generados por el método de Dice con 2% de tolerancia entre los carriles y el dendrograma se construyó en el mismo software por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages).

Detección de genes de virulencia, de resistencia a antibióticos e integrones: Se analizó la presencia de los genes de virulencia *rmpA*, *fimH*, *mrkD*, *entB*, *irP*, *iroNB*, *uge*, *urea*, *wabG* y *iucB* en los aislados de *Klebsiella* spp. mediante PCR de punto final, con los oligonucleótidos y

condiciones previamente descritas [5,19,20]. Además, se analizó la distribución de genes de resistencia a antibióticos beta-lactámicos (*blaCMY*, *blaCTX-M*, *blaOXA*, *blaSHV* y *blaTEM*), estreptomicina (*strA* y *strB*), tetraciclina (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* y *tetE*) y de la integrasa de integrones clase 1 y 2 (*intI1* e *intI2*), de acuerdo con lo descrito en la literatura [10,21,22]. En todos los casos, las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µL bajo las siguientes condiciones generales: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a temperatura variable dependiendo del par de oligonucleótidos por 30 s, un ciclo de extensión de entre 30 y 60 s y un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados se separaron y visualizaron como se mencionó anteriormente.

Resultados

Aislamiento e identificación de *Klebsiella* spp.: En nueve de las 10 muestras de leche recolectadas se obtuvo crecimiento bacteriano con el uso de, al menos, un antibiótico. Se seleccionaron 2 colonias al azar de cada caja de Petri obteniendo en total 50 aislados, de los cuales 26 (52%) fueron bacterias gramnegativas. Éstas últimas fueron fermentadoras de lactosa en agar MacConkey y 20 utilizaron citrato como única fuente de carbono y fueron capaces de fermentar inositol en agar citrato de Simmons con inositol (SCAI). El análisis molecular mediante PCR reveló que en esos 20 aislados bacterianos se obtuvo amplificación del fragmento ITS de 130 pb, lo cual confirmó su identidad

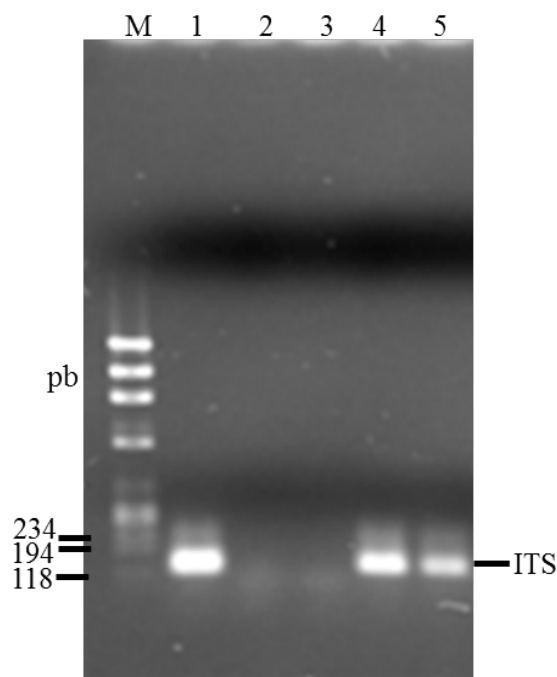


Figura 1. Fotografía de un gel de agarosa con resultados representativos de la identificación molecular, mediante la amplificación de la región ITS (130 pb) de *Klebsiella pneumoniae*. 1) Control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; 2) Control negativo sin DNA; 3) *E. coli* ATCC 25922; 4 y 5) Dos aislados de *Klebsiella pneumoniae*. M: marcador de peso molecular indicando el peso de algunas bandas.

como *Klebsiella pneumoniae* (Figura 1). Estos 20 aislados se clasificaron con la letra K del 1 al 20 (K1 a K20).

Concentración mínima inhibitoria para antibióticos y biocidas: Los datos obtenidos de la determinación de la CMI de los aislados contra 12 antibióticos revelaron que las concentraciones más altas en las que crecieron las bacterias fueron para ampicilina y carbenicilina, para los cuales 14 y 7 aislados presentaron CMI mayores a 1.024 µg/mL. Para gentamicina, kanamicina, estreptomycin y tetraciclina se observaron CMI de 512 µg/mL en 2, 5, 11 y 2 aislados, respectivamente. Por otro lado, las CMI más bajas se observaron para ciprofloxacina y meropenem, con valores menores a 0,25 µg/mL (Tabla 1).

El análisis de resistencia de los aislados frente a cinco biocidas reveló que las CMI fueron variables. Por ejemplo, para Chx se observaron CMI de 8, 16, 64 y 128 µg/mL con 8, 6, 4 y 1 aislados, respectivamente. Para Ctab se observó que a 128 y 256 µg/mL se inhibieron 13 y 7 aislados, mientras que para Gta, todas presentaron CMI > 1.024 µg/mL. Por su parte, para Cbe la CMI se determinó en el rango de 64 (17 aislados) y 128 µg/mL (3 aislados). Para Tri se observaron dos fenotipos contrastantes, por un lado 17 aislados fueron susceptibles al compuesto (CM < 0,125 µg/mL), y por el otro 3 fueron resistentes a concentraciones mayores de

1.024 µg/mL (Tabla 1).

Siguiendo los criterios establecidos, las bacterias se clasificaron como resistentes o susceptibles a los antibióticos. Se obtuvieron altos índices de resistencia para ampicilina y estreptomycin con 19 aislados para cada uno, seguido de tetraciclina con 18, carbenicilina con 17, gentamicina con 14 y cefixima con 12. Para los restantes ocho antibióticos el número de aislados bacterianos resistentes osciló entre 9 y cero. Los antibióticos en los que se observó mayor susceptibilidad fueron ceftazidima, ciprofloxacina y meropenem, siendo los 20 aislados susceptibles (Tabla 2). El análisis de los patrones de resistencia reveló que todas las *K. pneumoniae* presentaron resistencia de uno a 10 antibióticos de las cuales 14 aislados fueron resistentes a seis o más antibióticos y 17 fueron clasificadas como multirresistentes, ya que presentaron resistencia a tres o más familias diferentes de antibióticos (Tabla 2). De igual forma, de acuerdo con lo descrito en la literatura, las bacterias se clasificaron como resistentes o susceptibles a los biocidas y con esos datos se obtuvieron los perfiles de resistencia a esos compuestos (Tabla 2).

Formación de biopelículas: Los datos obtenidos indicaron que el 95% (19 aislados) de las *K. pneumoniae* tuvo la capacidad de formar biopelículas, mientras que el

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria de *Klebsiella pneumoniae* contra antibióticos y biocidas.

Antibióticos (Grupo)	Concentración (µg/mL)														
	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1.024	>1.024	
Beta-lactámicos															
Ampicilina (Ap)					1						2	1	2	14	
Carbenicilina (Cb)						1		1		1	1	3	6	7	
Cefixima (Cfm)		1	2	1	2	1		3	10						
Ceftazidima (Caz)		10		2	6	2									
Cefotaxima (Ctx)		10		1		7	2								
Fenicoles					3	4	4	4	3	2					
Fluoroquinolonas															
Ciprofloxacina (Cip)	20														
Gentamicina (Gm)					4	2		5	2	5		2			
Aminoglucósidos					6	2	1			3	3	5			
Estreptomycin (Stp)				1					1	3	4	11			
Carbapenémicos															
Meropenem (Mem)	20														
Tetraciclinas						2		1	1	2	11	2			
Biocidas															
Clorhexidina (Chx)						8	4		6	2					
Cloruro de Benzalconio (Cb)									17	3					
Bromuro de Cetiltrimetilamonio (Ctab)											13	7			
Glutaraldehído (Gta)														20	
Triclosán (Tri)	17													3	

Nota: Los números indican la cantidad de aislados que se inhibieron en cada concentración y el inicio de la zona gris muestra las concentraciones a partir de las cuales las bacterias se consideraron resistentes.

Tabla 2. Patrón de resistencia a antibióticos y biocidas de *Klebsiella pneumoniae*.

Patrón de resistencia		
Aislado	Antibióticos	Biocidas
K20	Tc	Cbe Ctab Gta
K2	Ap Cb Stp	Cbe Ctab Gta
K8	Ap Stp Tc	Cbe Ctab Gta
K1	Ap Caz Cb STP	Cbe Chx Ctab Gta
K3	Ap Cb Stp Tc	Cbe Chx Ctab Gta
K9	Ap Cfm Stp Tc	Cbe Ctab Gta
K5	Ap Cb Cm Gm Stp Tc	Cbe Ctab Gta Tri
K19	Ap Cm Gm Km Stp Tc	Cbe Ctab Gta
K12	Ap Cm Gm Km Stp Tc	Cbe Ctab Gta
K6	Ap Cb Cfm Ctx Gm Stp Tc	Cbe Chx Ctab Gta Tri
K13	Ap Cb Cfm Ctx Gm Stp Tc	Cbe Chx Ctab Gta
K15	Ap Cb Cfm Ctx Gm Stp Tc	Cbe Chx Ctab Gta
K18	Ap Caz Cb Cfm Ctx Gm Stp Tc	Cbe Chx Ctab Gta
K7	Ap Cb Cfm Cm Gm Km Stp Tc	Cbe Ctab Gta
K4	Ap Cb Cfm Cm Gm Km Stp Tc	Cbe Ctab Gta Tri
K16	Ap Cb Cfm Cm Gm Km Stp Tc	Cbe Ctab Gta
K10	Ap Cb Cfm Cm Gm Km Stp Tc	Cbe Ctab Gta
K14	Ap Cb Cfm Cm Gm Km Stp Tc	Cbe Chx Ctab Gta
K17	Ap Caz Cb Cfm Ctx Gm Km Stp Tc	Cbe Chx Ctab Gta
K11	Ap Caz Cb Cfm Cm Ctx Gm Km Stp Tc	Cbe Ctab Gta

Abreviaturas. *Beta-lactámicos*: Ap, ampicilina; Caz, ceftazidime; Cb, carbenicilina; Cfm, cefixima; Ctx, cefotaxima. *Aminoglucósidos*: Gm, gentamicina; Km, kanamicina; Stp, estreptomycin. *Fenicoles*: Cm, cloranfenicol. *Tetraciclinas*: Tc, tetraciclina. *Biocidas*: Cbe, cloruro de benzalconio; Ctab, bromuro de cetiltrimetilamonio; Gta, glutaraldehído; Tri, triclosán.

restante 5% (1 aislado) no las formó. De acuerdo con los resultados anteriores, el 25% de los aislados bacterianos se consideraron formadores débiles (DO 0,12-0,22), el 20% fueron formadores moderadas (DO 0,23-0,44) y el 50% se clasificaron como formadores fuertes (DO >0,44) (Figura 2).

Relación genética de las Klebsiella pneumonie: El análisis de relación genética mediante ERIC-PCR arrojó patrones de amplificación de fragmentos con tamaños que van de 200 a 5.000 pb. El agrupamiento de esos patrones indicó que los 20 aislados de *K. pneumonie* presentaron similitud genética por encima del 78% y, de acuerdo con su similitud, formaron en 3 grupos principales: el grupo I, conformado por 2 aislados con patrón de bandas idéntico; el grupo II, con cinco subgrupos de entre 1 y 5 aislados, tres subgrupos con patrones de bandas idénticos; y el grupo III, integrado

por 5 aislados con patrones de bandas diferentes (Figura 2).

Distribución de genes de virulencia, resistencia e integrones: Del análisis de 12 marcadores genéticos de virulencia se detectó la presencia de siete (Figura 2), de los cuales *mrkD* fue el más frecuente identificado en 15 aislados, seguido de *entB*, *uge* y *ureA* en siete aislados, mientras que *wagG*, *irP* y *fimH* se detectaron en 5, 4 y 4 aislados bacterianos, respectivamente. Por otro lado, en ningún aislado se detectó la presencia de *wzyK1* (*magA*), *wzyK2*, *rmpA*, *iroNB* e *iucB* (Figura 2).

De los resultados obtenidos de la detección de genes de resistencia se encontró que todos los aislados presentaron entre 1 y 6 genes, siendo *strA* el de mayor frecuencia, detectado en 18 aislados, seguido de *tetC*, *tetD* y *tetA* encontrados en 13, 10 y 9 aislados, respectivamente. Por su parte, *tetB*, *tetD*, *blaSHV* y *blaCTX-M* se detectaron en 6, 6, 5 y 4 aislados bacterianos, respectivamente. Con esos datos se obtuvieron los arreglos de genes de virulencia y resistencia en cada bacteria (Figura 2). Por otra parte, se detectó la presencia del gen de la integrasa de integrones clase I (*intI1*) en 11 aislados y no se observó el de la integrasa de integrones de clase 2 (*intI2*) (Figura 2).

Discusión

En México, la leche de vaca sin pasteurizar se utiliza para la elaboración de diversos productos artesanales como yogurt, queso, crema, mantequilla, y dulces, entre otros. Dichos productos son ampliamente aceptados por la población. Sin embargo, en ocasiones representan un riesgo a la salud de los consumidores, por la presencia de bacterias potencialmente patógenas y resistentes a los antibióticos. La presencia de bacterias en la leche se ve favorecida por las condiciones de almacenamiento, forma de obtención y el manejo y salud del ganado [23].

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la resistencia a los antibióticos de *K. pneumonie* aislada en leche de bovinos del área de estudio es común. Además, con una excepción (K20), todos los aislados fueron resistentes de tres a 10 antibióticos, con 17 aislados clasificados como multirresistentes, es decir, que mostraron resistencia a tres o más familias distintas de antibióticos. De manera general, se observó correspondencia entre el fenotipo de resistencia a los antibióticos y la presencia de genes de resistencia. Por ejemplo, nueve de los 11 aislados en los que se detectó alguna variante del gen *bla*, mostraron resistencia a cefalosporinas de tercera generación y todos fueron resistentes a otros beta-lactámicos, mientras que 18 de los 19 aislados, en los que se detectaron genes de resistencia a estreptomycin, fueron resistentes a ese compuesto. Por su parte, en 15 de los 18 aislados de *K. pneumonie* resistentes a tetraciclina se detectaron genes de resistencia. Cabe mencionar que solo se analizaron algunos mecanismos de resistencia de las familias de antibióticos beta-lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas para las cuales se observaron mayores índices de resistencia por los aislados de *K. pneumonie*, sin

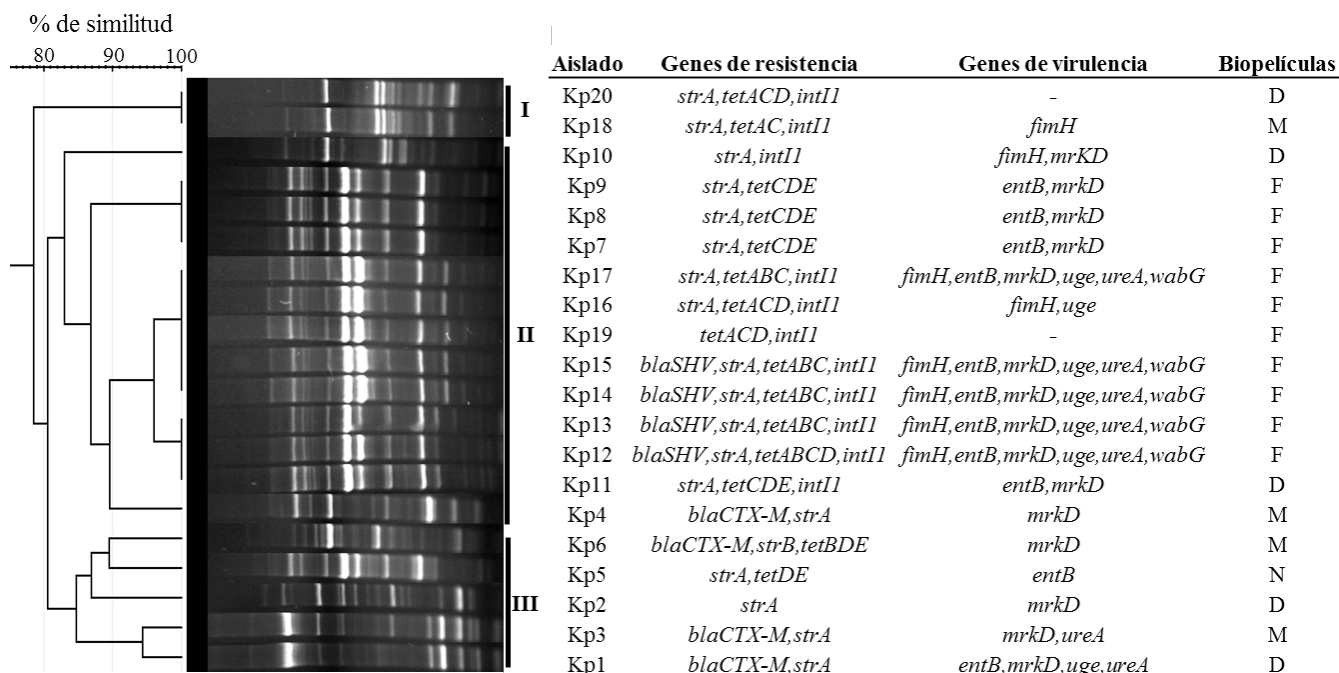


Figura 2. Relación genética de las 20 *Klebsiella pneumoniae* aisladas de leche de vaca. De acuerdo a la similitud en los patrones de bandas se incluyeron en tres grupos principales (I-III). También se muestran los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos encontrados en los aislados, así como la clasificación de acuerdo con la capacidad de formación de biopelículas en fuertes (F), moderados (M), débiles (D) y negativos (N).

embargo, la diversidad de mecanismos de resistencia es más amplia [24]. Además, en 11 de los aislados se encontró el gen de la integrasa de integrones clase I; la presencia de esos elementos en los aislados puede contribuir a la diseminación de los genes de resistencia, debido a que los integrones frecuentemente se encuentran en elementos genéticos móviles como transposones y plásmidos conjugativos [25].

En la literatura no hay reportes en los que se haya estudiado la resistencia de *K. pneumoniae* aisladas de leche bovina sin pasteurizar destinada al consumo humano, aunque si hay reportes de que a partir de leche de vacas con mastitis se han aislado especies de *Klebsiella* multirresistentes a los antibióticos [26,27]. La frecuencia de mastitis bovina es variable en diferentes regiones. En la zona donde se realizó este estudio la frecuencia de mastitis es del 50% [10]; otros reportes indican que la mastitis ocasionada por *Klebsiella* spp. puede ser de hasta 3,7% del total de casos [28], lo cual puede sugerir que es una posible fuente para el aislamiento de las bacterias analizadas en este trabajo. Otra fuente potencial es el ambiente donde habita el ganado, ya que las especies de *Klebsiella* son habitantes comunes de esos lugares [2]. Se ha descrito que el uso de antibióticos en ganado bovino, para el tratamiento de infecciones o como promotores de crecimiento, es uno de los principales factores que contribuye a la evolución de bacterias resistentes [29]. Por lo descrito anteriormente, nuestros datos y los reportes de la literatura sugieren que la ingesta de leche sin pasteurizar podría contribuir a que el consumidor entre en contacto con *Klebsiella* spp. y servir como reservorio. Además, se ha descrito que en infecciones intrahospitalarias por *K. pneumoniae*, los portadores gastrointestinales de la bacteria son la principal fuente de diseminación [30].

Por otro lado, las bacterias estudiadas presentaron resistencia a tres o cuatro de los biocidas analizados, lo cual sugiere que se han co-seleccionado los mecanismos de resistencia a antibióticos y biocidas, aunque se requiere más trabajo experimental para confirmar o descartar la hipótesis. Al respecto, estudios realizados en diferentes regiones, han mostrado la coexistencia de mecanismos de resistencia a biocidas y antibióticos en elementos genéticos móviles, por lo cual se ha estipulado que la resistencia a biocidas puede favorecer la resistencia y distribución de genes de virulencia [9,13]. Cabe resaltar la resistencia a triclosán de tres aislados, los cuales mostraron CMI superiores a 1.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este sentido algunos reportes de la literatura han descrito que los valores de CMI de triclosán para *K. pneumoniae* de diversos orígenes son de alrededor de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o menores [13,14]. Lo anterior indica que esos aislados probablemente tienen uno o más mecanismos de resistencia al compuesto. Los principales mecanismos de resistencia bacteriana a triclosán incluyen la sobre expresión de la proteína FabI, el blanco principal del compuesto, la expresión de versiones mutantes u homólogos de FabI, y la sobre expresión de transportadores que expulsan el compuesto, entre otros [31].

Los estudios de diversidad genética de *K. pneumoniae* se han enfocado principalmente a las obtenidas de muestras clínicas, y más recientemente se han empezado a estudiar las de origen bovino. Por ejemplo, *K. pneumoniae* aisladas de leche de vacas con mastitis presentan diferentes genotipos, incluso en aislados de una misma vaca [32]. De acuerdo con lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo indican que los 20 aislados presentan más del 78% de similitud genética y se incluyeron en tres grupos de entre dos y 13

aislados de *K. pneumoniae*. Además, en el análisis mediante ERIC-PCR, los aislados integrantes de los grupos I y II, que presentaron la mayor similitud, también arrojaron patrones similares de genes de resistencia, virulencia y formación de biopelículas, reafirmando su similitud, mientras que el grupo III fue más heterogéneo.

Se ha descrito que los principales factores de virulencia de *K. pneumoniae* son la cápsula, lipopolisacáridos, sideróforos y fimbrias, además de otros factores adicionales [33]. De acuerdo con lo anterior, en los aislados de leche se detectaron genes relacionados con fimbrias tipo 1 y 3 (cuatro y 15 aislados respectivamente), con síntesis de lipopolisacáridos y ureasa (siete aislados), y de sideróforos (ocho aislados). Además, ninguno de los serotipos capsulares de mayor importancia en clínica (K1 y K2) fue detectado en las bacterias estudiadas. Destacaron también cinco aislados en los que se detectó la combinación de seis genes de virulencia (*fimH-entB-mrkD-uge-ureA-wabG*), que incluyen genes de síntesis de lipopolisacáridos, fimbrias, sideróforos y ureasa, además que son formadores fuertes de biopelículas y multirresistentes a los antibióticos. Todo esto sugiere que tienen elevado potencial de virulencia. Acorde con lo anterior, se ha observado en modelos murinos que la virulencia de *K. pneumoniae* se relaciona directamente con el repertorio de genes que posee la bacteria [34].

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo revelan que aislados de *K. pneumoniae* con características genéticas y fisiológicas diversas se encuentran circulando en la leche de vaca de consumo local, las cuales, de acuerdo con los patrones de multirresistencia y perfiles de genes de virulencia obtenidos, representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores de leche sin pasteurizar o productos elaborados a partir de ella, como el queso fresco. Sin embargo, este primer estudio exploratorio se limitó a analizar dos establos en un lapso de tiempo corto, por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos, se considera importante expandir el análisis en un tamaño de muestra más representativo de la cuenca lechera de La Ciénega de Chapala, Michoacán, con el fin de conocer más a fondo la distribución bacterias resistentes a antibióticos y biocidas, su potencial de virulencia en leche de vaca sin pasteurizar y en los productos derivados de ella, así como relacionar la resistencia a los antibióticos con el uso de estos en la industria lechera.

Referencias

1. Wyres KL, Lam M, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020; 18:344-59. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
2. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016; 80:629-61. Doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
3. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017; 41:252-75. Doi: <https://doi.org/10.1093/femsre/flux013>
4. Lu B, Zhou H, Zhang X, Qu M, Huang Y, Wang Q. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates from stool specimens of outpatients in sentinel hospitals Beijing, China, 2010–2015. Gut Pathog. 2017; 9:39. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0188-7>
5. Zhang S, Yang G, Ye Q, Wu Q, Zhang J, Huang Y. Phenotypic and genotypic characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolated from retail foods in China. Front Microbiol. 2018; 9:289. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00289>
6. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. J Appl Microbiol. 2017; 123:1003-18. Doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13533>
7. Meyer B, Cookson B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? J Hosp Infect. 2010; 76:200-5. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.05.020>
8. Iñiguez-Moreno M, Ávila-Novoa MG, Iñiguez-Moreno E, Guerrero-Medina P, Gutiérrez-Lomelí M. Antimicrobial activity of disinfectants commonly used in the food industry in Mexico. J Global Antimicrob Resist. 2017; 1:143-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.013>
9. Vijayakumar R, Sandle T, Al-Aboody MS, AlFonaison MK, Alturaiki W, Mickymaray S, et al. Distribution of biocide resistant genes and biocides susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* - A first report from the Kingdom of Saudi Arabia. J Infect Public Health. 2018; 11:812-6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.05.011>
10. Jiménez-Mejía R, Gudiño-Sosa LF, Aguilar-López JA, Loeza-Lara PD. Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. Rev Mex Cienc Pecu. 2017; 8:387-96. Doi: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i4.4251>
11. Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. Int J Food Microbiol. 2008; 125:230-5. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.005>
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 32nd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
13. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant

- microorganisms. PLoS One. 2014; 9:e86669. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086669>
14. Kampf G. Antiseptic stewardship. First edition. Basel: Springer; 2018.
 15. Ares MA, Fernández-Vázquez JL, Rosales-Reyes R, Jarillo-Quijada M, von Bargen K, Torres J, et al. H-NS nucleoid protein controls virulence features of *Klebsiella pneumoniae* by regulating the expression of type 3 pili and the capsule polysaccharide. Front Cell Infect Microbiol. 2016; 6:1-13. Doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00013>
 16. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007; 115:891-9. Doi: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
 17. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991; 19:6823-31. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
 18. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, et al. GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. BMC Bioinformatics. 2015; 16:270. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
 19. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebise R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. PLoS One. 2009; 4:e4982. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
 20. Wasfi R, Elkhatib WF, Ashour HM. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. Sci Rep. 2016; 6:38929. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep38929>
 21. Guillaume G, Verbrugge D, Chasseur-Libotte M, Moens W, Collard J. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. FEMS Microbiol Ecol. 2000; 32:77-85. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00701.x>
 22. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44:1568-74. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1568-1574.2000>
 23. Iñiguez-Muñoz LE, Valencia-Botín AJ, Anaya-Esparza LM, Anzaldo-Ortega RE, Pliego-Sandoval JE, Reyes-Nava LA, Méndez-Robles MD. Leche cruda de vaca destinada a la elaboración de productos artesanales: calidad microbiológica y fisicoquímica. Biotecnia. 2022; 24:28-34. Doi: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i3.1635>
 24. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiol Spectr. 2016; 4:4-2. Doi: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
 25. Souque C, Escudero JA, MacLean RC. Integron activity accelerates the evolution of antibiotic resistance. Elife. 2021; 10:e62474. Doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.62474>
 26. Timofte D, Maciucă IE, Evans NJ, Williams H, Wattret A, Fick JC, et al. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58:789-94. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00752-13>
 27. Locatelli C, Scaccabarozzi L, Pisoni G, Moroni P. CTX-M1 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol. 2010; 48:3822-3. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.00941-10>
 28. Abdalhamed AM, Zeedan GSG, Abou Zeina HAA. Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. Vet World. 2018; 11:355. Doi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.355-362>
 29. Haulisah NA, Hassan L, Bejo SK, Jajere SM, Ahmad NI. High levels of antibiotic resistance in isolates from diseased livestock. Front Vet Sci. 2021; 8:652351. Doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.652351>
 30. Gorrie CL, Mirčeta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. Clin Infect Dis. 2017; 65:208-15. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>
 31. Shrestha P, Zhang Y, Chen W J, Wong TY. Triclosan: Antimicrobial mechanisms, antibiotics interactions, clinical applications, and human health. J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog. 2020; 38:245-68. Doi: <https://doi.org/10.1080/26896583.2020.1809286>
 32. Paulin-Curlee GG, Singer RS, Sreevatsan S, Isaacson R, Reneau J, Foster D, et al. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. J Dairy Sci. 2007; 90:3681-9. Doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2006-776>
 33. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. mSphere. 2016; 1:e00261-16. Doi: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00261-16>
 34. Jian-li W, Yuan-yuan S, Shou-yu G, Fei-fei D, Jia-yu Y, Xue-hua W, et al. Serotype and virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from mink and its pathogenesis in mice and mink. Sci Rep. 2017; 7:17291. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17681-8>