BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

"IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE *Klebsiella* spp. CLÁSICAS E HIPERVISCOSAS"

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA.

PRESENTA:

QFB. BRIGIDA MICHELLE VARGAS CRUZ

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

PUEBLA, PUE. NOVIEMBRE 2021

BUAP

Puebla, Pue. a 22 de noviembre 2021

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Brigida Michelle Vargas Cruz,** les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Identificación de genes de virulencia y resistencia a los antibióticos y caracterización parcial de plásmidos en cepas de *Klebsiella* spp. clásicas e hiperviscosas"

A nuestro juicio, la alumna **Brigida Michelle Vargas Cruz** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

A t e n t a m e n t e.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Claudia F. Martìnez de la Peña

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

D.C. Maria Elena Bello Lòpez

D.C. Miguel Castañeda Lucio

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA · 1578 · POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS

♦ **INSTITUCIONALES**

- A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,** por abrirme sus puertas una vez más y poder llevar con orgullo su nombre a cada lugar al que voy.

- Al **Instituto de Ciencias**, al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, y a la Coordinación del Posgrado en Microbiología,** por la atención y el apoyo brindado durante mi estancia en la maestría.

- Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad,** por permitirme poner en práctica los conocimientos adquiridos en mi formación académica y enlazar mi camino con grandes personas.

- Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional.

- Por el apoyo a este trabajo a través de los **"Proyectos VIEP para la consolidación de cuerpos académicos y conformación de redes de investigación" 100031833-VIEP2021**.

- Se agradece a la **Coordinación del Posgrado en Microbiología**, así como a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado** por el apoyo brindado para la presentación de este trabajo en los congresos asistidos.

- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca de maestría otorgada, con número de becario **992382**.

♦ **ACADÉMICOS**

- A la **D. C. Patricia Lozano Zarain** por permitirme formar parte de sus alumnos nuevamente, por la confianza para encomendarme otra bacteria difícil y de la cual fui aprendiendo poco a poco. Gracias por toda la atención prestada, por el empeño y dedicación que le agrega a todo lo que se propone realizar. Me siento muy afortunada de recibir cada regaño, pero también cada palabra de aliento y felicitación de usted.

- A la **D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia** por las enseñanzas, sugerencias y comentarios realizados a este trabajo. Gracias por todos los momentos amenos compartidos en el laboratorio junto a mis demás compañeros y la Dra. Paty.

- A la **D. C. Claudia F. Martínez de la Peña** por tomarse el tiempo en explicarme y orientarme en la escritura de esta tesis, y por sus comentarios que fueron indispensables en este trabajo.

- Al **D. C. Miguel Castañeda Lucio** por contribuir con sus valiosos comentarios y sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

- A la **D. C. María Elena Bello López** por seguir guiándome en esta segunda etapa de mi formación, por tu disposición para resolver las dudas que surgieron en el camino y por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis. Pero principalmente gracias por tu amistad y tu apoyo incondicional.

- A la **Mtra. Jessica Gómez Martínez** por brindarme tu apoyo desde el inicio de la maestría, por las asesorías para el manejo de las diferentes herramientas bioinformáticas y por las risas y la retroalimentación en los seminarios interminables.

♦ **PERSONALES**

- A mi **familia** que ya no está físicamente, gracias por todas sus enseñanzas y bonitos recuerdos que llevo en mi mente.

- A mi tío **Genaro** por sus consejos y palabras de aliento que siempre me han servido de guía.

- A mi novio **Jesús** por apoyarme y comprenderme durante este proceso. Gracias por alentarme a seguir con mis sueños y por enseñarme las cosas importantes de la vida.

- A mis amigos incondicionales **Ceci, Magdiel, Valente, Mario y Yuli,** por utilizar las palabras adecuadas cada que las necesito y estar conmigo siempre.

- A las niñas Dynamo: **Karla**, **Arely, Ale y Elisa,** que por razones que no puedo explicar la vida nos reunió y soy muy feliz por ello. Gracias por las risas y por todo el apoyo durante el tiempo que estuve escribiendo esta tesis.

- A mis compañeritos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad por permitirme aprender junto con ustedes en el laboratorio y de manera virtual. A los de mayor experiencia **Elena, Ger, Edwin, Jessi, Cristy** y **Yess.** A **Marco** por enseñarme y dejarme ser ayudante de *Klebsiella* junto con **Dianita**. A **Suemy**, **Pato, Flor, Eder, Deysi, Jimmy, Lore, Brenda, Miranda, Midory, René, Mariela, Vero y Laurita,** por formar un ambiente de trabajo bonito y por todos los convivios compartidos.

- A mis **compañeros de generación**, porque aprender junto a ustedes fue de las mejores sorpresas que me tenía preparado el posgrado.

DEDICATORIA

- Esta tesis está dedicada a mi mamá **Luci** por todo su amor, comprensión e incansable apoyo para lograr cada objetivo que me propongo, a mi papá **Marcos** por sus palabras de aliento y por siempre tenerme presente, a mi hermanita **Ale,** por ser mi cómplice en cada cosa que se nos ocurre hacer, a mi hermana **Fany** y mi cuñado **Iván** por todo su apoyo y respaldo, a mi hermana **Frida** y mi cuñado **For** por todo su cariño y consejos, a mis sobrinas **Aranza**, **Sally** y **Marijo**, por ser los amores de mi vida y a mis mascotas **Coffe** y **Baco** que siempre alegran mi día. Compartir junto a ustedes siempre será lo mejor que existe, por eso hoy como siempre mis logros son también de ustedes.

Brigida Michelle Vargas Cruz

ÍNDICE

1 ABREVIATURAS 14

2 RESUMEN 15

3 INTRODUCCIÓN 16

3.1 El género *Klebsiella* spp. y su importancia clínica 17
3.2 Cepas clásicas de *Klebsiella pneumoniae* 18
3.3 Cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* 19
3.4 Resistencia a antibióticos 21
3.4.1 Genes de resistencia a β-lactámicos 21
3.4.2 Resistencia a antibióticos carbapenémicos 22
3.5 Plásmidos de resistencia 23
3.6 Plásmidos de virulencia 24
3.7 Factores de virulencia 25
3.7.1 Cápsula 25
3.7.2 Lipopolisacárido 27
3.7.3 Adhesinas fimbriales 28
3.7.3.1 Fimbria tipo I 28
3.7.3.2 Fimbria tipo III 29
3.7.3.3 Pili común de *E. coli* 30
3.7.3.4 Pili tipo IV 30
3.7.3.5 Sideróforos 32

4 ANTECEDENTES 34

4.1 Antecedentes generales 34
4.2 Antecedentes específicos 36

5 JUSTIFICACIÓN 38

6 OBJETIVO GENERAL 39

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES 39

7 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO 40

8 MATERIAL Y MÉTODOS 41

8.1 Estudio de las cepas de *Klebsiella* spp. 41
8.1.1 Datos de las cepas de *Klebsiella* spp. 41
8.1.2 Obtención de lisado bacteriano para PCR 41
8.1.3 PCR de genes de resistencia a β-lactámicos 42
8.1.4 Extracción de plásmidos por el método de Kieser 43
8.1.5 Determinación de número y tamaño de plásmidos 44
8.1.5.1 Electroforesis en gel de campos pulsados 44
8.1.5.2 Preparación de los insertos: 45
8.1.5.3 Lisis bacteriana: 45

8.1.5.4 Lavado de los insertos: 45
8.1.5.5 Digestión enzimática: 45
8.1.5.6 Electroforesis: 46
8.1.6 Caracterización parcial de plásmidos por “PCR-based replicon typing” 46
8.1.7 Oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de genes de virulencia..... 49
8.2 Secuenciación masiva de tres cepas de *Klebsiella pneumoniae* 51
8.2.1 Análisis de calidad de las lecturas (FastQC) 52
8.2.2 Ensamble de genomas con Spades 3.9 y Velvet 1.2.10..... 53
8.2.3 Evaluación de los ensambles 53
8.2.4 Anotación de las secuencias 53
8.2.5 Tipificación de las cepas..... 54
8.2.6 Determinación de los genes de resistencia a antibióticos y plásmidos.. 55
8.2.7 Determinación de genes de virulencia..... 56
8.2.8 Comparación de las secuencias genéticas y aminoacídicas de las adhesinas fimbriales 56
9 RESULTADOS 58
9.1 Resultados de las cepas de *Klebsiella* spp. 58
9.1.1 Genotipo de resistencia a los antibióticos..... 58
9.1.2 Extracción plasmídica por el método de Kieser y PFGE-S1 59
9.1.3 PFGE con nucleasa S1 de las cepas hipermucoides 61
9.1.4 Caracterización parcial de plásmidos 62
9.2 Resultados del análisis bioinformático de las cepas de estudio..... 63
9.2.1 Resultados del análisis de calidad de las lecturas (FastQC) 64
9.2.2 Resultados de la evaluación de los ensambles 64
9.2.3 Determinación de la especie y grupo filogenético..... 64
9.2.4 Determinación de la Secuencia Tipo 65
9.2.5 Clasificación del locus K y O 66
9.2.6 Resistencia a antibióticos 68
9.2.6.1 Genotipo de resistencia a antibióticos..... 68
9.2.6.2 Elementos Genéticos Movilizables (EGM) 72
9.2.7 Genotipo de virulencia 73
9.2.7.1 Genes asociados a la síntesis de la cápsula..... 73
9.2.7.2 Adhesinas fimbriales 74
9.2.7.3 Sideróforos..... 75
9.2.7.4 Otros factores de virulencia..... 76
9.2.8 Resultados del análisis de la organización genética de las adhesinas fimbriales 76
9.2.8.1 Fimbria tipo I 76
9.2.8.2 Fimbria tipo III 78
9.2.8.3 Pili tipo IV 79
10 DISCUSIÓN..... 81

11 CONCLUSIONES 92

12 PERSPERCTIVAS 93

13 REFERENCIAS 94

14 ANEXOS 114

14.1 Datos de las cepas utilizadas para la comparación de las secuencias genéticas y aminoacídicas de las adhesinas fimbriales. 114
14.2 Análisis de calidad de las lecturas obtenido con FastQC 114
14.3 Resultados del análisis de calidad de los ensambles obtenidos con SPAdes 3.9 y Velvet 1.2.10 obtenido con Quast 115
14.4 Propiedades de proteínas putativas de la cepa N021 115
14.5 Propiedades de proteínas putativas de la cepa CM155 y CM175 116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Características que definen (en negrita) al patotipo hvKp, que incluyen elementos cromosómicos y codificadas por plásmidos.	20
2	Combinaciones de los genes de resistencia encontrados en las 75 cepas de *Klebsiella* spp. de los hospitales ISSSTE, IMSS, ISSSTEP y LAB. CLINICO.	58
3	a) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, de los productos de extracción de plásmidos por el método de Kieser de cepas resistentes a carbapenémicos. b) PFGE-S1 de las 9 cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos.	59
4	Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, de los productos de extracción de plásmidos por el método de Kieser de 5 cepas sensibles a carbapenémicos.	60
5	PFGE-S1 de las 9 cepas hipermucoides.	61
7	Identidad de nucleótidos promedio (ANI) de las cepas N021, CM155 y CM175 con respecto a KpI, KpII y KpIII.	65
8	Relación del ST20 de la cepa CM175 con el complejo clonal CG20 de los linajes MDR de *Klebsiella* spp.	66
9	Representación del locus K de las cepas de estudio y la cepa hvKp NTUH-K2044 obtenido con "Kaptive Web".	67
10	Representación del locus O de las cepas de estudio y la cepa hvKp NTUH-K2044 obtenido con "Kaptive Web".	68
11	Genotipo de resistencia a antibióticos de las cepas N021, CM155 y CM175.	69

12	Dendograma que representa a las variantes de *fos.*	70
13	Genes y mutaciones asociados a resistencia a antibióticos.	71
14	Representación de los genes de *acrAB* y *oqxAB* presentes en la cepa KCTC 2242 y las 3 cepas de estudio que codifican para bombas de expulsión del antibiótico.	72
15	Genes que codifican para reguladores de la síntesis capsular.	73
16	Genes de virulencia que codifica adhesinas fimbriales encontrados en las cepas de *Klebsiella* spp.	74
17	Genes de virulencia que codifican sideróforos encontrados en las cepas de *Klebsiella* spp.	75
18	Otros genes asociados con la virulencia presentes en las cepas de estudio.	76
19	Organización genética de la región *fim* presente en las cepas analizadas.	77
20	Organización genética de la región *mrk* presente en las cepas analizadas.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Título	Página
1	Características de las cepas cKp y hvKp de *K. pneumoniae.*	20
2	Datos de 9 cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo de hiperviscosidad positivo y su perfil de resistencia a antibióticos.	37
3	Condiciones de PCR y oligonucleótidos empleados para la amplificación de genes de resistencia a antibióticos β-lactámicos.	43
4	Elementos y cantidades utilizadas para las reacciones de PCR.	43
5	Oligonucleótidos utilizados para la caracterización parcial de plásmidos por el método PBRT.	47
6	Condiciones de PCR para la caracterización parcial de plásmidos por el método PBRT.	48
7	Elementos y cantidades utilizadas para las PCR múltiplex.	48
8	Elementos y cantidades utilizadas para las PCR simplex.	48
9	Oligonucleótidos para la determinación de genes de virulencia de *Klebsiella* spp.	50
10	Datos de las cepas de *Klebsiella* spp. previamente secuenciadas.	52
11	Resultados de los grupos de incompatibilidad presentes en los plásmidos de 9 cepas de *Klebsiella* resistentes a antibióticos carbapenémicos.	62

12	Resumen de los resultados obtenidos de la caracterización parcial y el perfil plasmídico de 9 cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos.	63
13	Tipificación de las cepas de *Klebsiella* spp.	66
14	Mutaciones presentes en el regulador AcrR y en las porinas Ompk36 y Ompk37.	71
15	Elementos Genéticos Móviles identificados en las cepas de estudio.	72
16	Porcentajes de identidad de aminoácidos de la fimbria tipo I de las cepas de *Klebsiella* spp.	78
17	Porcentajes de identidad de aminoácidos de la fimbria tipo III de las cepas de *Klebsiella* spp.	79
18	Porcentajes de identidad de aminoácidos del pili tipo IV de las cepas de *Klebsiella* spp.	80

1 ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLEE	β-lactamasas de Espectro Extendido
BET	Bromuro de Etidio
CC	Complejos Clonales
cKp	Cepas clásicas de *K. pneumoniae*
ECP	Pili común de *E. coli*
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGM	Elementos Genéticos Móviles
HMV	Hipermucoviscoso
hvKp	Cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
ICE	Elementos Cromosómicos Integrados
ITU	Infecciones del Tracto Urinario
Inc	Incompatibilidad
LMHyC	Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad
LPS	Lipopolisacárido
MDR	Multidrogo resistente
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
RAM	Resistencia a Antimicrobianos
SNC	Sistema Nervioso Central
SE	Buffer Sal y EDTA
ST	Secuencia Tipo
TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TLR4	Receptor 4 Tipo Toll
TSA	Agar Soya Tripticaseína
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBRT	PCR-based replicon typing
PFGE	Electroforesis en Gel de Campos Pulsados
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
XDR	Extremadamente resistente

2 RESUMEN

Introducción: *Klebsiella* spp. son con frecuencia patógenos oportunistas causantes de infecciones hospitalarias. La especie de mayor importancia clínica es *Klebsiella pneumoniae*, la cual ha ganado interés debido a la aparición de cepas hipervirulentas y cepas clásicas multirresistentes. Recientemente, se informa de la confluencia entre los genes de resistencia y virulencia de ambos patotipos mediado por plásmidos, lo que ha propiciado que surjan cepas potencialmente peligrosas para la salud.
Objetivo: Identificar genes de virulencia y resistencia a los antibióticos y caracterizar parcialmente plásmidos en cepas de *Klebsiella* spp. clásicas e hiperviscosas obtenidas de hospitales y la comunidad.
Materiales y Métodos: Se trabajó con 75 cepas y 3 genomas de *Klebsiella* spp. aisladas de pacientes de hospitales y de la comunidad de Puebla y Ciudad de México del periodo 2016-2018. Se buscaron los genes de resistencia a β-lactámicos: *bla*$_{SHV}$ (9 cepas), *bla*$_{TEM}$ (9 cepas), *bla*$_{CTX-M}$ (10 cepas), *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$ y *bla*$_{IMP}$ (9 cepas) de algunas cepas. Se determinó el perfil y caracterización de plásmidos de las cepas resistentes a carbapenémicos (Kieser, PFGE-S1 y Carattoli), así como el perfil de plásmidos de las cepas hipermucoides. Se realizó el ensamble y anotación de la secuencia de 3 genomas de *Klebsiella* spp. (FastQC v0.11.9, SPAdes 3.9 y Velvet 1.2.10, RAST 2.0) con lo cual se llevó a cabo un análisis comparativo de los genes de resistencia, virulencia y elementos genéticos móviles por diferentes herramientas bioinformáticas (MLST 2.0, ANI calculator, Kaptive web, Pathogenwatch, ResFinder 4.1, PlasmidFinder 2.1, PathogenFinder 1.1 y VFDB).
Resultados: Los sitios de aislamiento de las cepas fueron: urocultivo 42.2%, hemocultivo 20%, lavado bronco alveolar 17.7%, y otros 31.1%. De los servicios de: medicina interna 26.6%, pediatría 16.6%, nefrología 11.6% y otros 44.9%. Se identificó en un 92% a *bla*$_{SHV-1}$, 81.3% *bla*$_{TEM-1}$, 65.3% *bla*$_{CTX-M-15}$. Las cepas MDR resistentes a carbapenémicos portaron plásmidos de los grupos Inc: FIA, Y, FIC y CoelETp. Los genomas de las 3 cepas secuenciadas correspondieron a *K. quasipneumoniae* (1) y *K. pneumoniae* (2), las ST fueron: 1542, 867 y 20. Se encontraron genes de resistencia a β-lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, entre otros. Los antígenos K y O fueron: KL22/O5, KL81/OL101, KL28/O1v2 y los genes de virulencia incluyeron: fimbrias tipo I, III, IV y ECP, el locus completo de los genes de enterobactina y otros genes como: *T6SS, hlyIII, pgaABCD, mivM y kfuBC*.
Conclusiones: Los plásmidos de las cepas resistentes a carbapenémicos se relacionaron con grupos de incompatibilidad distintos a IncN no antes relacionados con *bla*$_{VIM.}$ Se determinó la especie correcta de la cepa N021 como *K. quasipneumoniae* reportada por primera vez de un hospital pediátrico de la Ciudad de Puebla. Se determinaron nuevas variantes de *fosA* y las cepas CM155 y CM175 portaron *bla*$_{CTX-M-15}$, uno de los cuales se asoció al plásmido de tipo IncN, donde la cepa CM175 perteneció a los clones MDR de alto riesgo del ST20, KL28, O1v2. Las cepas hipermucoides no portaron *magA, rmpA o rmpA2*. Además, se encontraron los genes *iutA, kfuBC*, reportados en cepas hipervirulentas. En este estudio se encontró una gran diversidad alélica en los genes que codifican para las adhesinas fimbriales, así como diferencias en su contenido de genes.
Palabras claves: *Klebsiella pneumoniae*, factores de virulencia, mecanismos de resistencia.

3 INTRODUCCIÓN

Klebsiella spp. es uno de los patógenos oportunistas causantes de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) más comunes a nivel mundial (Wyres *et al*., 2020) y es el principal agente identificado en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) en México (RHOVE, 2015). De acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS), *Klebsiella pneumoniae* productora de β-lactamasa de espectro extendido (BLEE) resistente a carbapenem es reconocida como una amenaza para la salud pública, donde, la colistina es el antibiótico utilizado como último recurso para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales por bacterias del orden *Enterobacterales* (por ejemplo*, E. coli, Klebsiella*, *Enterobacter*, etc.) resistentes a los antibióticos carbapenémicos. Sin embargo, se detectan bacterias resistentes a colistina en diferentes países, por lo que en algunos casos no existe un tratamiento antibiótico eficaz (WHO, 2020).

K. pneumoniae es considerada la especie de mayor importancia clínica, causante de una gran variedad de infecciones, que a su vez se puede clasificar en dos patotipos: cepas clásicas de *K. pneumoniae* (cKp) y cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKp). En el entorno hospitalario es común el aislamiento de patógenos oportunistas como es el caso de las cepas cKp, que pueden causar infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario (ITU) e infecciones del torrente sanguíneo en pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Las cepas cKp muestran resistencia a uno o más antibióticos que a veces incluye a los carbapenémicos, debido a la acumulación de genes de resistencia adquiridos por transferencia horizontal mediante plásmidos y elementos genéticos móviles (EGM), que incluyen secuencias de inserción, transposones, integrones entre otros. Dentro de los más importantes, se encuentran los genes que codifican para la expresión de carbapenemasas (p. Ej., *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{OXA-48}$) y BLEE (p. Ej., *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{SHV}$ y *bla*$_{TEM}$). Por otra parte, el patotipo hvKp se reconoce como un patógeno virulento que causa infecciones adquiridas en la comunidad y que puede afectar a personas inmunocomprometidas, pero también a individuos sanos sin importar la edad o el sitio anatómico. El síndrome característico es el absceso hepático

piogénico, seguido de neumonía, fascitis necrosante, endoftalmitis y meningitis (Navon-Venezia *et al*., 2017; Russo *et al*., 2018; Lee *et al*., 2017).

En un inicio, a las cepas hvKp se les asocia con una mayor producción de cápsula, que da como resultado un fenotipo hipermucoviscoso (HMV), el cual se puede determinar por una prueba de cuerda positiva. Sin embargo, la evidencia sugiere que existen otros biomarcadores más precisos (los genes *rmpA*, *rmpA2*, *iroBCDN*, *iutA*, *iucABCD* y *ybt*) relacionados con la hipervirulencia, debido a que el fenotipo HMV también lo expresan las cepas cKp (Choby *et al*., 2020; Liao *et al*., 2020).

Al igual que las cepas clásicas, las cepas hipervirulentas adquieren genes de virulencia codificados en plásmidos (p. Ej., pLVPK y pK2044) y dentro de elementos cromosómicos integrados (ICE). Actualmente se informa de la confluencia entre los genes de resistencia y genes de virulencia de ambos patotipos en los mismos plásmidos, lo que da como resultado cepas potencialmente peligrosas. Si bien las cepas hvKp predominan en países asiáticos, las infecciones causadas por este patotipo comienzan a adquirir mayor importancia en países occidentales donde prevalecen las cepas cKp (Choby *et al*., 2020; Wyres *et al*., 2020).

3.1 El género *Klebsiella* spp. y su importancia clínica

Klebsiella spp. es una bacteria Gram negativa, encapsulada, con forma de bastón, no móvil, con un genoma flexible de un tamaño aproximado de 5 a 6 Mbp que le permite la colonización exitosa de una gran variedad de nichos (Choby *et al*., 2020; Holt *et al*., 2015). El género *Klebsiella* consta actualmente de 13 especies: *K. pneumoniae* (subespecie *pneumoniae*, subespecie *ozaenae* y subespecie *rhinoscleromatis*), *K. quasipneumoniae* (subespecie *quasipneumoniae y* subespecie *similipneumoniae*), *K. variicola*, *K. africana, K. granulomatis*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. grimontii*, *K. pasteurii*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis*, *K. indica* (https://lpsn.dsmz.de/genus/*klebsiella*) y una especie "*K. quasivariicola*" que no ha sido publicada válidamente (Ma *et al*., 2021; Patro & Rathinavelan, 2019; Wyres *et al*., 2020). *Klebsiella* spp. forma parte de la microbiota intestinal de humanos y

animales, además pueden colonizar una amplia variedad de hospederos (por ejemplo; plantas y mamíferos) y se encuentran de forma ubicua en el agua dulce, agua salada y suelo. Por lo que es común que sea aislado de alimentos de origen animal y vegetal; además puede encontrarse frecuentemente en superficies hospitalarias (Bagley, 1985; Wyres & Holt, 2018).

La especie de mayor importancia clínica es *K. pneumoniae,* la cual es reconocida como un patógeno oportunista importante responsable de una amplia variedad de IAAS. Actualmente han surgido dos patotipos de especial preocupación para los profesionales de la salud, las cepas cKp, que suelen ser resistentes a diferentes familias de antibióticos utilizados en la práctica clínica y aisladas de fuentes hospitalarias, y cepas hvKp a las que se les asocia con determinados factores de virulencia y que afectan a personas de la comunidad (Choby *et al*., 2020). Dado que *Klebsiella* es ubicuo en el ambiente y a que es un colonizador del tracto gastrointestinal humano, el inicio de las infecciones suele originarse por contaminación de la propia microbiota del paciente. Las cepas cKp son adquiridas en hospitales y se pueden transmitir de un paciente a otro. Mientras que las cepas hvKp también pueden adquirirse en hospitales, pero cuando se trata de infecciones adquiridas en la comunidad, se ha visto que se requiere antes de su transporte intestinal. En áreas donde hvKp es endémica, la diseminación entre persona y persona puede ser la vía fecal-oral. Esto se observa en un estudio realizado en Taiwán en el que se encuentra una fuerte asociación entre la colonización gastrointestinal y el absceso hepático en 43 pacientes, así como el transporte de hvKp en individuos sanos (Fung *et al*., 2012; Gorrie *et al*., 2017).

3.2 Cepas clásicas de *Klebsiella pneumoniae*

Actualmente, cKp es el patotipo dominante en el mundo, es uno de los principales patógenos causantes de infecciones adquiridas en hospitales y una causa importante de sepsis neonatal. Razón por la que la mayoría de las infecciones oportunistas se encuentran relacionadas con la atención de la salud y por ende denominadas como infecciones “clásicas” (Choby *et al*., 2020). Afectan a pacientes más vulnerables

como recién nacidos, ancianos y aquellos que hacen uso de dispositivos médicos. Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran la neumonía e infecciones del tracto urinario, que comúnmente progresan a bacteriemia. Las cepas clásicas representan un gran desafío para los médicos debido al aumento de las cepas multidrogo resistentes (MDR), y resistentes a carbapenem. Actualmente, las opciones de tratamiento para cKp son limitadas y resurge la necesidad del uso de antibióticos que se encuentran en desuso como la colistina o el interés en el desarrollo de nuevas vacunas (Wyres *et al*., 2020).

3.3 Cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae*

Las cepas hvKp se describen por primera vez en Taiwán en pacientes que presentaron abscesos hepáticos piógenos causados por un tipo invasivo de *K. pneumoniae,* los cuales muestran complicaciones extrahepáticas como meningitis, absceso prostático y oftalmía piógena (Liu *et al*., 1986). Estas cepas son causa importante de infecciones adquiridas en la comunidad y suele afectar a individuos sanos. Su prevalencia oscila entre el 12% y el 45% en zonas endémicas, principalmente en países del continente asiático. Sin embargo, existe un incremento en el número de casos en todo el mundo, por ejemplo, en Europa y América del norte (Choby *et al*., 2020).

Las formas clínicas de las cepas hvKp son diversas, principalmente se presenta en forma de abscesos hepáticos piogénicos con tendencia a la diseminación metastásica, los sitios más comunes son el ojo, el pulmón y el Sistema Nervioso Central (SNC), que incluyen infecciones como: endoftalmitis, uveítis, meningitis, absceso pulmonar, absceso cerebral, absceso epidural, infecciones de los tejidos blandos y huesos, fascitis necrotizante, osteomielitis y endocarditis. Además, se reporta con menos frecuencia su diseminación a la próstata, riñones y bazo. También puede causar bacteriemia, neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto biliar, infección en tejidos blandos, donde los sitios primarios de infección no incluyen el hígado (Cheng *et al*., 1991; Fang *et al*., 2007; Siu *et al*., 2012).

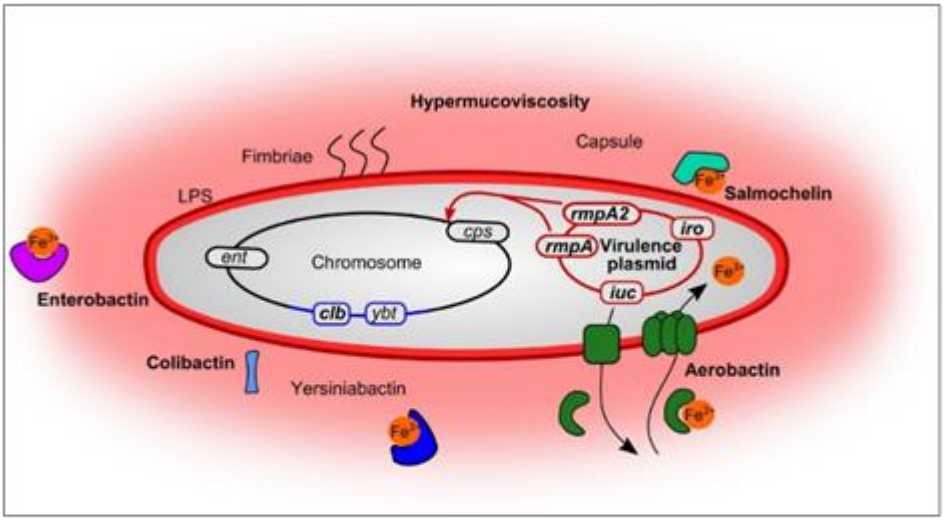


Figura 1.- Características que definen (en negrita) al patotipo hvKp, que incluyen elementos cromosómicos y codificadas por plásmidos. (Tomado de Choby *et al*., 2020).

Diferentes grupos de investigación llevan a cabo estrategias para comprender las diferencias entre las cKp y hvKp (tabla 1). Donde se determina que las manifestaciones clínicas, la Secuencia Tipo (ST), el tipo de cápsula, el fenotipo HMV y la presencia de genes de virulencia pueden utilizarse para su diferenciación (figura 1). No obstante, aún no existe una categorización adecuada para definir por completo a las cepas hvKp. Entre los biomarcadores más precisos de cepas hvKp se encuentran: *peg-344, iroB, iucA, rmpA/rmpA2* de plásmidos (Russo *et al*., 2018).

Tabla 1.- Características de las cepas cKp y hvKp de *K. pneumoniae.*

Parámetro	**Patotipo**	
	cKp	**hvKp**
Tipo de infección adquirida	Entorno hospitalario	Comunidad
Poblaciones	Inmunocomprometidos (diabéticos, pacientes con neoplasias)	Personas sin enfermedades subyacentes e inmunocomprometidos
Concentración geográfica	Todo el mundo	Principalmente Taiwán y el sudeste asiático
Tipos comunes de infección	Neumonía, ITU, bacteriemia	Absceso hepático piógeno, bacteriemia, neumonía, meningitis, endoftalmitis
Frecuencia de informes de resistencia a los antibióticos	Frecuente (BLEE y producción de carbapenemasas)	Poco frecuente

ITU: Infección del tracto urinario, BLEE: β-lactamasa de espectro extendido.
(Modificado de Russo & Marr, 2019; Russo *et al*., 2018).

3.4 Resistencia a antibióticos

La crisis de la resistencia a los antibióticos es un problema de salud que ha ido en aumento en los últimos años, hospitales de todo el mundo se enfrentan con infecciones causadas por patógenos multirresistentes que son cada vez más difíciles de tratar. Los patógenos más frecuentemente involucrados se incluyen en el grupo denominado ESKAPE, que incluye bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Enterococcus* spp*, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa y Enterobacter* spp*.* Con el paso del tiempo estas bacterias se vuelven resistentes a todos o la mayoría de los antibióticos disponibles debido en gran parte a la transferencia horizontal de genes facilitado por plásmidos y EGM (Wyres & Holt, 2018).

En particular, *K. pneumoniae* es considerado como un dispersor clave de genes de resistencia a antibióticos dentro del género, pero también para otras bacterias Gram negativas clínicamente importantes, esto con base a la alta diversidad de genes de resistencia adquiridos, alta carga de plásmidos, contenido de G + C y su amplio rango ecológico (Wyres & Holt, 2018).

3.4.1 Genes de resistencia a β-lactámicos

K. pneumoniae contiene en su cromosoma al gen *bla*$_{SHV}$ que le confiere resistencia a la ampicilina debido a la producción de la enzima β-lactamasa SHV de clase A (Holt *et al*., 2015). En otras especies de *Klebsiella* también se conservan los ortólogos de esta β-lactamasa, por ejemplo: LEN para *K. variicola* y OKP para *K. quasipneumoniae,* aunque LEN y OKP también se reportan en cepas de *K. pneumoniae* (Rodrigues *et al*., 2019). Además de *bla*$_{SHV}$, otros genes que codifican BLEE se detectan por primera vez en *K. pneumoniae,* por ejemplo, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CMY}$ y *bla*$_{CTX-M}$. Durante los años 1990-2000 *K. pneumoniae* alberga principalmente β-lactamasas de tipo TEM y SHV, lo que permite la posterior aparición y diseminación de diversos alelos en muchas partes del mundo (Chong & Kamimura, 2011). Posteriormente, surge otro tipo de BLEE presentes en cepas de *K. pneumoniae*, este

fue CTX-M. El cual es responsable de brotes hospitalarios ya que se encuentra ampliamente distribuido, está presente en una gran variedad de plásmidos y transposones de *Escherichia coli* y *K. pneumoniae* (Calbo y Garau, 2015).

Otros genes de *K. pneumoniae* productora de BLEE, incluyen a *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{SFO}$, *bla*$_{PER}$, *bla*$_{TLA}$ y *bla*$_{VEB}$ (Philippon *et al.,* 2016). En los últimos años, se ha visto que *K. pneumoniae* es uno de los principales patógenos portadores de BLEE asociado con brotes hospitalarios, con tasas endémicas de hasta el 50% en muchas partes del mundo y tasas de resistencia de hasta el 30% en la comunidad (Navon-Venezia *et al.*, 2003; Cantón *et al*., 2008).

3.4.2 Resistencia a antibióticos carbapenémicos

Debido al incremento de la resistencia a antibióticos por la aparición endémica de *K. pneumoniae* productora de BLEE es necesario el empleo de otros antibióticos como los carbapenémicos (imipenem y meropenem), los cuales se utilizan como última línea para el tratamiento de las infecciones por *K. pneumoniae,* sin embargo, pronto se encuentran cepas resistentes a estos antibióticos. La primera metalo-β-lactamasa detectada fue IMP-1 en Japón en 1991 y posteriormente en 1996 se reporta en Estados Unidos por primera vez la serín β-lactamasa de *K. pneumoniae,* es decir la carbapenemasa KPC (Navon-Venezia *et al*., 2017).

Debido a la importancia que tiene la propagación de cepas resistentes a múltiples fármacos, a las cepas de *K. pneumoniae* se les clasifica de acuerdo con su ST, la cual se determina por la secuencia de nucleótidos de 7 genes “housekeeping” (Bialek-Davenet *et al*., 2014; Wyres *et al*., 2020). A su vez, los ST que se encuentran estrechamente relacionados se denominan Complejos Clonales (CC). En los últimos años se observa la diseminación mundial de cepas de *K. pneumoniae* portadoras de KPC, que corresponden al ST258 del CC258, donde las variantes más comunes son *bla*$_{KPC-2}$ y *bla*$_{KPC-3}$ (Bowers *et al*., 2015; Paczosa & Mecsas, 2016).

También se informa de otros genes de carbapenemasas en *K. pneumoniae*, por ejemplo, en el 2003 y 2004 se reporta *bla*$_{OXA-48}$ y *bla*$_{VIM-1}$ en diversos brotes

hospitalarios principalmente en Europa y en el 2008 se detecta a *bla*$_{NDM-1}$ transmitido por plásmidos, que años más tarde se detecta en otras especies de enterobacterias e incluso a Bacilos Gram Negativos como *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Poirel *et al*., 2004; Yong *et al*., 2009). Mientras que la primera carbapenemasa tipo GES en *K. pneumoniae* fue *bla*$_{GES-4}$, aunque estas enzimas son poco frecuentes y se reportan en países como: Grecia, Finlandia, Corea del Sur y Brasil (Lee *et al*., 2016).

Aunque la principal causa de la resistencia a carbapenémicos es debido a la presencia de β-lactamasa con actividad carbapenemasa existen casos en los que la resistencia a dichos antibióticos surge incluso sin la presencia de estas enzimas, debido principalmente a las alteraciones de la permeabilidad celular por pérdida de porinas o por la sobreexpresión de bombas de expulsión (Navon-Venezia *et al*., 2017). Es bien conocido, que ciertas mutaciones en los genes que codifican porinas y bombas de expulsión pueden aumentar la resistencia a diversos antibióticos. Por ejemplo, los cambios en la expresión de las bombas OqxAB y AcrAB, se les asocia con la resistencia a múltiples antibióticos como fluoroquinolonas, nitrofurantoína, cloranfenicol, carbapenémicos e incluso tigeciclina. Por otra parte, las mutaciones en las porinas como Ompk36 y Ompk35 contribuyen a la resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* (Wyres *et al*., 2020; Navon-Venezia *et al*., 2017).

3.5 Plásmidos de resistencia

El resistoma y el mobiloma de *Klebsiella* spp contribuyen al surgimiento de cepas MDR y extremadamente resistentes (XDR) de diferentes ST o clones epidémicos. Éstos a su vez pueden combinarse con cepas que tienen un alto potencial epidémico y dar paso a la propagación de linajes multirresistentes globales de alto riesgo (Navon-Venezia *et al*., 2017).

Los tipos de plásmidos más prevalentes en *Klebsiella* spp. son aquellos de tipo IncFIIk e IncFIB, que incluso se pueden encontrar en estado de multireplicón. Dos de los plásmidos de tipo IncFIB e IncFIIk son pKPQIL y pKPN3 respectivamente, que comúnmente se encuentran en cepas del grupo clonal CG258 (Leavitt *et al*., 2010).

El plásmido pKPN3 inicialmente se asocia con el ST258, en él se encuentran los genes *catA1*, *mphA*, *dfrA* y *aadA*, que le confieren resistencia a cloranfenicol, macrólidos, trimetoprima y estreptomicina, respectivamente (García-Fernández *et al*., 2012). Posteriormente el plásmido pKPQIL también se encuentra en aislamientos ST258 en muchas partes del mundo, pero tiene codificado el gen *bla*$_{KPC}$ ubicado en el transposón Tn440a, así como el transposón Tn3, asociado al gen *bla*$_{TEM}$ (Chen *et al*., 2014). Entre otros plásmidos portadores de *bla*$_{KPC}$, se describen a los de tipo IncN, IncX3, IncR, IncHI1 e IncI2, que tienen un amplio rango de hospederos y que son responsables de la transferencia de *bla*$_{KPC}$ entre miembros del orden *Enterobacterales* (Chen *et al*. 2013). También, se describen una gran variedad de plásmidos que codifican a las metalo-β-lactamasas VIM, IMP y NDM y de tipo OXA o GES. Por ejemplo, *bla*$_{VIM-1}$ se encuentra en plásmidos de tipo IncN1 en cepas no relacionadas aisladas de distintos hospitales; así como, plásmidos IncN1 similares que albergan a *bla*$_{IMP}$ (Miriagou *et al*., 2010). Aquellos plásmidos que contienen a *bla*$_{NDM}$ pertenecen principalmente a IncA/C2, IncHI1, IncX3 e IncN2. Así mismo, se describen otros plásmidos portadores de *bla*$_{NDM,}$ como pNDM-MAR de los replicones HIB-M y FIB-M, que también pueden codificar *bla*$_{CTX-M-15}$, *qnrB1*, *aac6-1B*, *bla*$_{OXA-1}$, *catB3* (Villa *et al*., 2012). El gen *bla*$_{OXA-48}$, se ve asociado al replicón IncL en plásmidos conservados descritos en diferentes partes del mundo, mientras que *bla*$_{GES}$ pueden ser de tipo IncN los cuales se informan en China (Navon-Venezia *et al*., 2017; Poirel *et al*., 2012; Papagiannitsis *et al*., 2015).

3.6 Plásmidos de virulencia

Las cepas hvKp también pueden albergar plásmidos que contienen genes de virulencia, incluidos *rmpA, rmpA2*, *iroBCDN* e *iucABCDiutA.* Dos de los plásmidos de virulencia mejor conocidos que albergan a los genes anteriores son pLVPK y pK2044 de cepas del ST23, ambos muy parecidos de un tamaño de 219 385 pb y 224 152 pb respectivamente, los cuales carecen de genes *tra* y no son conjugativos (Chen *et al*., 2004; Wu *et al*., 2009). También se reporta el plásmido hibrido pVir de 297 984 pb, que se encuentra en una cepa ST11 resistente a carbapenémicos, tigeciclina y colistina (Huang *et al*., 2018). En *K. variicola* se encuentra descrito el plásmido

conjugativo p15WZ-82_Vir que contiene a los genes de virulencia *rmpA, rmpA2, iroBCDN e iucABCDiutA*, el cual surge a partir de un plásmido conjugativo (Yang *et al*., 2019). Todos los plásmidos anteriormente descritos corresponden a los replicones IncHI1B/IncFIB que se reportan en Taiwán y China (Yang *et al*., 2021).

Como resultado de la evolución de los patotipos cKp y hvKp, cada vez es más común encontrar aislados clínicos que sean resistentes a carbapenémicos e hipervirulentos (Wyres *et al*., 2020). Entre los genes que codifican carbapenemasas que se reportan en estas nuevas cepas son *bla*$_{\text{KPC-2}}$, *bla*$_{\text{NDM-1}}$, *bla*$_{\text{OXA-48}}$, *bla*$_{\text{VIM-1}}$, *bla*$_{\text{VIM-2}}$ y *bla*$_{\text{IMP-6}}$, pero también se encuentran cepas resistentes a carbapenémicos debido a la disminución de la expresión de las porinas Ompk35 y Ompl36 junto con la producción de BLEE (Zhang *et al*., 2015). La transferencia de determinantes de resistencia y los genes de virulencia *rmpA, rmpA2, iroBCDN e iucABCDiutA* al mismo tiempo promueve la rápida aparición de cepas de *Klebsiella* causantes de diferentes brotes en hospitales y que plantean problemas importantes en el tratamiento de las infecciones por *K. pneumoniae* (Gu *et al*., 2018; Chen *et al*., 2020).

3.7 Factores de virulencia

Las cepas de *Klebsiella* spp. utilizan un conjunto de factores de virulencia para protegerse de la respuesta inmune del hospedero y sobrevivir en diferentes sitios anatómicos. Los 4 factores de virulencia mejor caracterizados incluyen a los polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos, sideróforos y adhesinas fimbriales o pili (Paczosa & Mecsas, 2016). Sin embargo, cada vez son más los factores de virulencia descritos para *Klebsiella* como el sistema de secreción tipo VI, proteínas de membrana externa, porinas, bombas de eflujo, biopelículas, entre otros (Patro & Rathinavelan, 2019; Martin & Bachman, 2018).

3.7.1 Cápsula

Las cepas del género *Klebsiella* poseen una cápsula indispensable para la virulencia, está constituida de oligosacáridos lineales o ramificados que se encuentran en la superficie de la célula bacteriana (Paczosa & Mecsas, 2016). En *Klebsiella,* el tipo de

cápsula o antígeno K se utiliza ampliamente para la serotipificación, se han descrito más de 130 tipos de antígenos K, incluidos los 77 antígenos K conocidos tradicionalmente y los de la serie KL basados en la disposición del locus K (Wyres *et al*., 2016). La cápsula le permite a las bacterias resistir a las condiciones hostiles del ambiente y le confiere protección contra los mecanismos de la respuesta inmune innata, previene la fagocitosis y opsonofagocitosis por parte de las células inmunitarias, protege de la acción bactericida de los péptidos antimicrobianos, evita la interacción con los componentes del complemento y bloquea el reconocimiento del LPS por receptores de las células inmunes de manera que la respuesta inflamatoria es menos exacerbada (Martin & Bachman, 2018; Paczosa & Mecsas, 2016; Patro & Rathinavelan, 2019). A pesar de la amplia diversidad de cápsulas que se pueden encontrar en *Klebsiella,* solo algunos antígenos K estan relacionados con la hipervirulencia, estos son: K5, K20, K47, K54, K57 y K64 donde los tipos K1 y K2 son los más prevalentes, se encuentran aproximadamente en el 70% de los aislados hvKp (Russo & Marr, 2019).

Algunas de las cepas cKp y hvKp son HMV debido a que tienden a aumentar la producción de cápsula. En un estudio donde se asocia el fenotipo hipermucoide con los genes *rmpA* y *rmpA2* de cepas hvKp, se observa que mutaciones en *rmpA* de cepas hvKp resulta en la pérdida del fenotipo HMV y afecta la producción de cápsula, además de mostrar una disminución de la virulencia cuando se hacen pruebas en ratones (Walker & Miller, 2020). A pesar de que la evidencia sugiere que el fenotipo HMV se asocia con la sobreproducción de cápsula, también hay informes donde mutaciones en el gen *rmpC* provoca una disminución de la producción de la cápsula, pero no afecta el fenotipo HMV, lo que sugiere que la sobreproducción de cápsula normalmente da como resultado un fenotipo HMV, pero no es un requisito que siempre se cumple (Walker *et al*., 2019). Para determinar el fenotipo hipermucoide se utiliza comúnmente la prueba de cuerdas, el cual es un ensayo cualitativo en el que la formación de una “cuerda” mayor a los 5 mm es considerado como un fenotipo HMV positivo; sin embargo, hay cepas que pueden formar cuerdas de varios centímetros. Otra prueba que se puede utilizar en el que permite distinguir diferentes grados de mucoidía es el ensayo de sedimentación, donde las cepas HMV se

diferencian de las no hipermucoides después de la centrifugación, ya que en las primeras el sobrenadante permanece turbio y las segundas forman gránulos apretados en el fondo y sobrenadantes transparentes (Walker *et al*., 2019; Walker & Miller, 2020).

3.7.2 Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) está compuesto por un antígeno O, el cual está conformado por una cadena repetida de polisacáridos y es la parte más externa del LPS, un oligosacárido central y un lípido A anclado a la membrana externa de la bacteria. Estas estructuras están codificadas en los grupos de genes *rfb*, *waa* y *lpx* respectivamente (Paczosa & Meczas, 2016). El LPS se encuentra en todas las bacterias Gram negativas, en *Klebsiella* le confiere protección contra péptidos antimicrobianos catiónicos, pero en especial le permite resistir al ataque del sistema del complemento. Cuando el antígeno O se encuentra en longitud completa o "LPS liso", las cepas son resistentes a la muerte mediada por el complemento, por otra parte, cuando las cepas tienen el antígeno O ausente o truncado, también denominado "LPS rugoso" entonces son susceptibles a la muerte mediada por el complemento (Merino *et al*., 1992). Otro mecanismo que emplea *Klebsiella* para evadir la respuesta inmune es la modificación del lípido A, que es la porción lipídica del LPS. Cuando se encuentra en los pulmones, sufre una modificación de 2-hidroxiacilo de manera que no activa la respuesta inflamatoria como lo hace en su forma nativa (Llobet *et al*., 2015). Aunque la presencia del LPS puede ser benéfico, también puede ser perjudicial debido a que es un ligando importante del receptor 4 tipo toll (TLR4 por sus siglas en inglés) que conduce a la producción de citocinas y quimiocinas que actúan como atrayentes de neutrófilos y macrófagos para combatir las infecciones por *K. pneumoniae* (Paczosa & Mecsas, 2016; Patro & Rathinavelan, 2019).

Se describen 11 tipos de antígenos O (O1, O2a, O2ac, O2afg, O2aeh u O9, O3, O4, O5, O7, O8 y O12) y al igual que el antígeno K, también se utiliza para la tipificación de *Klebsiella* spp. La serotipificación consiste en reconocer a los distintos

polisacáridos de superficie de antígenos O y antígenos K, por un determinado anticuerpo. Una herramienta útil para la tipificación del antígeno O y el antígeno K, es “Kaptive Web”, en la cual se analizan los loci K y O que codifican para la cápsula y el antígeno O respectivamente (Wick *et al*., 2018; Wyres *et al*., 2016). De acuerdo con la seroepidemiología de *K. pneumoniae,* los serotipos O más prevalentes de aislamientos causantes de infecciones corresponden a O1, O2 y O3 (Follador *et al*., 2016; Patro & Rathinavelan, 2019), donde el serotipo O1 es el más común entre los aislamientos de muestras clínicas, así como en cepas HMV (Hsieh *et al*., 2012). La biosíntesis del antígeno O se lleva a cabo por una vía dependiente del transportador ABC en donde están involucradas tres tipos de enzimas: las responsables de la síntesis de azúcares activados por nucleótidos, aquellas implicadas en la síntesis de unidades repetidas de polisacáridos y las que se encargan del ensamblaje de unidades repetidas y transporte a través de la membrana (Follador *et al*., 2016). Hasta la fecha, se describen 9 de estos grupos de genes: O1/O2, O3/O5, O4, O8, O12, OL101, OL102, OL103 y OL104 (Artyszuk *et al*., 2020).

3.7.3 Adhesinas fimbriales

Las fimbrias o pilis son otros factores de virulencia importantes que están involucrados en la adhesión (Pacsoza & Mecsas, 2016). En *K. pneumoniae* se ha estudiado ampliamente a la fimbria tipo I y la fimbria tipo III, la primera tiene un papel importante en el desarrollo de las infecciones urinarias y la segunda en la formación de biofilm (Chen *et al*., 2011; Struve *et al*., 2009).

3.7.3.1 Fimbria tipo I

La fimbria tipo I se puede encontrar en la mayoría de los miembros de *Enterobacterales,* son apéndices que irradian peritricamente desde la superficie celular que tienen un tamaño aproximado de 1 µm. Los genes necesarios para su biosíntesis se encuentran ubicados en el operón cromosómico conocido como *fim.* El gen *fimA* codifica la subunidad principal, los genes *fimF* y *fimG* codifican dos

subunidades menores y el gen *fimH* que codifica una adhesina ubicada en la punta de las fimbrias que reconoce a glicoproteínas que contienen manosa (Struve *et al*., 2008). La manosa está presente en el uroepitelio, y por lo tanto permite que las bacterias se adhieran y colonicen la superficie del tracto urinario. Por esta razón, a estas fimbrias también se les denomina como “sensibles a manosa” (Schembri *et al*., 2005). Por otra parte, los genes involucrados en el transporte y ensamble de la fimbria tipo I son: el gen *fimC* que codifica para una chaperona fimbrial y *fimD* que codifica para una proteína “Usher” ubicada en la membrana externa. La expresión de la fimbria esta mediada por una región promotora invertible (*fimS*), ubicada río arriba del gen que codifica para la subunidad principal, donde participan dos recombinasas codificadas por *fimB* y *fimE* que determinan el fenotipo fimbriado o no fimbriado a través de señales ambientales. Además, se describen otros genes como *fimI* y *fimK*, el primero codifica para un producto no caracterizado y el segundo podría participar en la regulación de la expresión de la fimbria tipo I (Paczosa & Mecsas., 2016; Pusz *et al*., 2014). En un estudio en el que realiza una mutante de deleción del gen *fimK*, dio como resultado niveles de expresión más altos del pili tipo I y formación de biofim (Rosen *et al*., 2008).

3.7.3.2 Fimbria tipo III

La fimbria tipo III se reporta en diferentes géneros bacterianos que incluye a *Klebsiella,* son apéndices resistentes a manosa que tienen un tamaño que va de 0.5 a 2.0 µm de largo, se encuentran codificadas en los genes *mrkABCDF,* los cuales pueden estar ubicados en cromosoma y plásmidos (Struve *et al*., 2009). El gen *mrkA* codifica para la subunidad mayor, *mrkB* y *mrkC,* codifican para una chaperona y una proteína usher respectivamente, y *mrkD* y *mrkF,* que codifican para subunidades fimbriales menores. Entre sus funciones se encuentra la adherencia a la matriz extracelular como el colágeno, células epiteliales de la tráquea, células tubulares renales, así como la formación de biofilm en superficies abióticas como los catéteres (Chen *et al*., 2011). Un ejemplo de ello son los tubos endotraqueales, donde MrkA se puede unir a las superficies plásticas del catéter y posteriormente MrkD se une a la

matriz extracelular de células bronquiales del hospedero que recubren el dispositivo, lo que conduce a una mayor persistencia de *K. pneumoniae* en los pulmones (Jagnow & Clegg, 2003).

3.7.3.3 Pili común de *E. coli*

La formación de biofilm también esta mediada por el pili común de *E. coli* (ECP), el cual es necesario para la interacción bacteria-bacteria. Se encuentra codificado en el operón cromosómico *ecpRABCDE* (Alcántar-Curiel *et al*., 2013). Está conformado por la subunidad principal EcpA de 21 kDa y una subunidad menor EcpD que forma una adhesina en la punta del pili, se ensamblan a través de la vía alternativa con ayuda de dos chaperonas periplásmicas, EcpB y EcpE, y una proteína usher EcpC, mientras que EcpR es un activador transcripcional (Pakharukova *et al*., 2015). Anteriormente, se demuestra que las cepas de *E. coli* patógenas humanas, animales y comensales eran capaces de producir esta fimbria a 37 ^{o}C y ayudar en la adherencia celular en *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enteroagregativa y en *E. coli* enterotoxigénica. Además, un homólogo del grupo de genes *ecpRABCDE,* también está presente en otros géneros de importancia clínica como *K. pneumoniae* y participa en la adhesión celular y formación de biofilm (Alcántar-Curiel *et al*., 2018; Araújo *et al*., 2018).

3.7.3.4 Pili tipo IV

Los pili tipo IV son apéndices superficiales, formados por subunidades de proteínas conocidas como pilinas, que funcionan a través de su polimerización reversible mediante sistemas de ensamblaje y desensamblaje, lo que da como resultado ciclos rápidos de extensión y retracción, impulsado por una adenosina trifosfatasa de ensamblaje de T4P (ATPasa), de esta manera el cuerpo basal extrae los monómeros de pilina de la membrana interna y los adiciona a la base del pilus. Posteriormente, el cuerpo basal con ayuda de una ATPasa de desmontaje extrae los monómeros de la base del pilus de regreso a la membrana (Chang *et al*., 2016). Los pili tipo IV están

compuesto por múltiples copias de pilina que forman filamentos extremadamente delgados (50 a 80 Å) (Craig *et al*., 2019). Entre sus funciones destaca la motilidad superficial, la formación de biopelículas, la adhesión a la célula hospedera, la señalización celular, la captación de ácido desoxirribonucleico (ADN) por transformación y la unión de fagos (Craig & Tainer, 2004). Se puede dividir en dos subclases, el tipo IVa y IVb. El tipo IVa tiene una secuencia líder corta de 5 a 6 aminoácidos mientras que la del pili tipo IVb es de 15-30 aminoácidos, además tiene una secuencia madura más corta de aproximadamente 150 aminoácidos en comparación con la de tipo IVb de 190 aminoácidos; su residuo N-terminal es fenilalanina y esta puede variar para las pilinas de tipo IVb (metionina, leucina y valina). Los pili tipo IVa pueden estar presentes en una gran variedad de bacterias como *Neisseria* spp, *P. aeruginosa*, *Dichelobacter nodosus*, *Moraxella bovis*, *Moraxella nonliquifaciens*, *Eikenella corrodens*, entre otras. Mientras que los pili tipo IVb se han descrito en *V. cholerae*, *Salmonella entérica* y *Escherichia coli.* (Chang *et al*., 2016). Las proteínas que constituyen los pili tipo IV son la proteína principal PilA, que contiene una hélice α hidrófoba N-terminal que puede estar anclada a la membrana interna o agrupada con otras hélices α de PilA; la proteína PilQ, que forma un poro en la membrana externa por el cual el filamento es proyectado hacia el exterior y que además forma parte del anillo periplásmico. También forman parte de esta estructura las subunidades PilM, PilN, PilO, PilP que son proteínas de alineamiento que sujetan al filamento para su proyección, y las proteínas PilB que corresponden a la ATPasa de ensamblaje y PilC a una ATPasa de retracción, estas a su vez pueden interactuar con los dominios citoplasmáticos de la proteína de plataforma PilT (Craig *et al*., 2019; Chang *et al*., 2016).

En el equipo de trabajo se detecta un apéndice filamentoso con características similares a los pili tipo IV en cepas de *K. pneumoniae*. Se identifica el gen *pilA* en 26 de 28 cepas. Además, con base a las similitudes de la secuencia de *pilA* con otras pilinas, se identifica la pilina tipo IV de clase “a” en una cepa de *K. pneumoniae.* Se observa que los aislamientos tienen una mayor movilidad en la superficie en medio BHI con 2% de agar después de las 72 horas de incubación a 37 ^{o}C. Así mismo, se estudia la expresión de *pilA* en las cepas 003 y 021 (Nombrada en este trabajo como

N021), donde se determina que la expresión de *pilA* en la cepa 003 aumenta desde un nivel basal a las 24 horas observándose un máximo de su expresión a las 72 horas, mientras que en la cepa 021 la máxima expresión de *pilA* es a las 48 horas y disminuye gradualmente hasta las 96 horas, lo que sugiere que posiblemente existen sistemas regulatorios distintos en ambas cepas (López-Reynoso, 2019).

3.7.3.5 Sideróforos

Los sideróforos son sistemas de adquisición del hierro que expresan las bacterias para prosperar en un determinado sitio anatómico y promover la infección en el hospedero. Son moléculas quelantes que adquieren de forma competitiva el hierro de las proteínas del hospedero para después ser internalizado por medio de receptores de superficie. En *K. pneumoniae* se describen cuatro sistemas: enterobactina, yersiniabactina, salmochelina y aerobactina (Paczosa & Mecsas, 2016). Ambos patotipos de *K. pneumoniae* tienen codificado en el cromosoma el sistema de enterobactina (Ent) y en ocasiones yersiniabactina (Ybt). Mientras que las cepas hvKp se caracterizan por sintetizar comúnmente los sistemas de aerobactina (Iuc) y salmochelina (Iro). Lo sideróforos varían en sus afinidades de unión al hierro, donde la aerobactina tiene la afinidad más baja y la enterobactina la más alta y aunque su función puede ser redundante, la producción de más de un sideróforo puede ser una forma de optimizar la colonización de diferentes tejidos o evitar su neutralización por el hospedero (Lam *et al*., 2018; Martin & Bachman, 2018).

La expresión de enterobactina es ubicua en las cepas de *K. pneumoniae* y es neutralizada por la lipocalina-2 secretada por el hospedero. Por lo que, cuando está ausente la lipocalina-2, la enterobactina permite la colonización y diseminación en los pulmones (Bachman *et al*., 2011). El sideróforo de yersiniabactina se encuentra en el 18% de los aislamientos clásicos y el 90% de los aislamientos hvKp, suele expresarse durante las infecciones pulmonares y no se inhibe por la lipocalina-2, pero en presencia de transferrina no puede adquirir hierro para su crecimiento (Bachman *et al*., 2011). La salmochelina es una enterobactina glicosilada, esta modificación evita que sea inhibida por la lipocalina-2 y permite la colonización

nasofaríngea, la salmochelina está presente aproximadamente del 2 al 4% de las cepas clásicas y en 90% en cepas hvKp (Fischbach *et al*., 2005; El Fertas-Aissani *et al*., 2013; Hsieh *et al*., 2008). Por último, la aerobactina es un sideróforo de tipo hidroxamato, que está presente en el 93-100% de las cepas hvKp y en un 6% en cepas clásicas. La presencia de aerobactina suele asociarse con una hipercápsula, debido a que los genes que codifican este sideróforo suelen encontrarse en el mismo plásmido que alberga al regulador transcripcional *rmpA* (Paczosa & Mecsas, 2016; Russo *et al*., 2015; Wyres *et al*., 2020).

4 ANTECEDENTES

4.1 Antecedentes generales

Las cepas hvKp tienen una mayor prevalencia en países del continente asiático, tan solo en Taiwán, se registran más de 3000 casos nuevos de abscesos hepáticos piogénicos cada año (Lin *et al*., 2011). Estas cepas son más virulentas en comparación con las cepas clásicas de *K. pneumoniae,* sin embargo, en los últimos años se reportan casos en los que se aíslan cepas de hvKp, que también adquieren resistencia a antibióticos. En el 2016, se reporta un estudio en China de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de 5 pacientes sometidos a cirugía y que posteriormente reciben ventilación mecánica. Todos los pacientes fallecieron por neumonía grave y por una respuesta deficiente al tratamiento con antibióticos, ya que las cepas fueron resistentes a carbapenémicos. Estas cepas pertenecen al ST11, con fenotipo hipermucoide positivo. Además, se observa que las cepas resistentes a carbapenémicos habían adquirido un plásmido de virulencia pLVPK-like de un tamaño aproximado de 170 Kb. (Gu *et al*., 2018). Otro estudio que muestra la convergencia entre la resistencia a antibióticos y la hipervirulencia en las mismas cepas es el realizado en Singapur, donde se analizan 556 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos durante 2010 a 2015. Se obtiene que 18 aislamientos de 7 pacientes contienen un plásmido estrechamente relacionado con pKPC2 que alberga al gen *bla*$_{KPC-2}$, los serotipos encontrados son K1, K2 y K20 y los aislados de 5 pacientes presentan el fenotipo HMV. Aquí se destaca que el plásmido pKPC2 es altamente transmisible, por lo que los resultados muestran la posible propagación de *K. pneumoniae* hipervirulento resistente a carbapenémicos en Singapur (Chen *et al*., 2020). En otro estudio realizado en China, se aíslan 21 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos; las cuales también contienen al gen *bla*$_{KPC,}$ 20 portaron *bla*$_{SHV-11}$ y 15 cepas *bla*$_{CTX-M-65.}$ Los genes de virulencia más prevalentes fueron *ureA* (100%), *wabG* (100%), *fimH* (95.2%), *entB* (95.2%), *ycf* (95.2%), *ybtS* (95.2%), *iutA* (90.5%) y *rmpA* (57.1%). Además del ST11, se identifica a la ST268, ST65, ST692 y ST595. Este estudio fue un brote hospitalario en UCI, debido a la diseminación de ST11 hipermucoviscoso de *K. pneumoniae* con

resistencia a carbapenémicos productores de KPC-2, por lo que se destaca la importancia de la vigilancia eficaz y medidas de control de las infecciones debido a este patotipo (Zhan *et al*., 2017).

En México los estudios realizados de *Klebsiella* spp. se enfocan principalmente al estudio de la resistencia a los antibióticos de aislamientos provenientes de hospitales. Una visión rápida de la resistencia a antibióticos en México se describe en el informe retrospectivo de 10 años de la Resistencia a Antimicrobianos (RAM) de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Donde se recolectan 22,943 aislados clínicos en el periodo de enero a junio de 2018, que incluye a 47 centros en 20 estados. Se obtiene que la resistencia a carbapenémicos es del ≤3% en *E. coli*, 12.5% en *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp., y de hasta el 40% en *P. aeruginosa.* Para *Acinetobacter* sp. se obtiene ≥50% para cefepime, ciprofloxacino, meropenem, y piperacilina-tazobactam. En general *Acinetobacter* sp. presenta la mayor resistencia MDR con un 53%, seguido de *Klebsiella* sp. con 22.6% y *E. coli* con 19.4%. Este estudio destaca la importancia de la vigilancia de la RAM y como es el incremento de la resistencia a diferentes antibióticos en distintas especies bacterianas en México (Garza-González *et al*., 2019).

Poco se ha hecho por caracterizar a las cepas de *K. pneumoniae* u otras especies causantes de infecciones adquiridas en la comunidad. Sin embargo, en el 2018, se estudian 39 cepas de *Klebsiella* spp. obtenidas de pacientes ambulatorios en cuatro hospitales rurales de México. Se identifican 36 aislamientos como *K. pneumoniae,* 1 de *K. variicola,* 1 de *K. quasipneumoniae y* 1 de *K. quasivariicola.* El 10.2% de las cepas fue productor de BLEE en las cuales también se identifica al gen *bla*$_{\text{CTX-M-15.}}$ En el análisis del fenotipo de hipermucoviscosidad se obtiene a 7 cepas positivas. Los serotipos encontrados son K2 (4), K5 (2) y K54 (1), donde las 7 cepas para el fenotipo hipermucoide son positivas para los serotipos K2 y K5. La ST más prevalente es ST29 en un 19% y los factores de virulencia más prevalentes son las fimbrias, seguidos de los sideróforos (Garza-Ramos *et al*., 2018).

Mas tarde se reporta un estudio en el que se describe por primera vez a cepas hvKp con fenotipo hipermucoide del serotipo K2 de los ST86 y ST380 en América Latina y

en México. Los aislamientos contienen al plásmido pLVPK-like responsable de conferir la hipermucoviscosidad y el fenotipo de virulencia. Estas cepas hvKp del serotipo K2 son susceptibles a los antibióticos y contienen el gen *rmpA*, genes de los sideróforos de aerobactina, salmochelina y enterobactina (Catalán-Nájera *et al*., 2019).

4.2 Antecedentes específicos

En el trabajo realizado por Pérez-Sánchez se determina la resistencia a antibióticos de 75 cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de 4 hospitales y de un Laboratorio Clínico privado de la Ciudad de Puebla y México. Los aislados se identifican a nivel de género por Vitek2® y pruebas bioquímicas. De las cuales 69 cepas corresponden a *K. pneumoniae* y 6 a *K. oxytoca*. El 94.2% de las cepas de *K. pneumoniae* son resistentes a antibióticos β-lactámicos, 88.4% a aminoglucósidos, 85.5% a tetraciclinas, 81.1% a sulfamidas, 69.5 a quinolonas y 26% a fenicoles. Mientras que el 100% de las cepas de *K. oxytoca* son resistentes a β-lactámicos y aminoglucósidos, 50% a tetraciclinas y sulfonamidas, y 16.6% a fenicoles y quinolonas. El fenotipo BLEE se observa en el 69.3% de las cepas, mientras que el fenotipo AmpC no se observa en ninguna cepa. El genotipo de resistencia a antibióticos muestra lo siguiente: el 93.3% de las cepas porta *bla*$_{SHV}$, 80% de las cepas a *bla*$_{TEM}$ y el 72% el gen *bla*$_{CTX-M.}$ De un total de 9 cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos, 3 cepas de *K. oxytoca* y 5 de *K. pneumoniae* portan el gen *bla*$_{VIM}$. Además, se identifica a la variante *bla*$_{VIM-23}$ asociado a un integrón de clase 1 en las cepas KoE37 (*K. oxytoca*) y KpS1 (*K. pneumoniae*) aisladas de diferentes hospitales. 9 cepas son hipermucoides y ninguna porta el gen *rmpA*, de las cuales las 5 cepas del Hospital I.S.S.S.T.E. son resistentes a antibióticos (tabla 2) (Pérez-Sánchez, 2021).

Tabla 2. – Datos de 9 cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo de hiperviscosidad positivo y su perfil de resistencia a antibióticos**.**

Procedencia	Clave cepario	Origen de la muestra	Prueba de cuerdas	Tamaño de cuerda (cm)	*rmpA*	Perfil de resistencia a antibióticos
ISSSTE	KpE23	U	+	> 5	Negativo	TE, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT
	KpE46*	LBA	+	> 0.5	Negativo	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TE, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT
	KpE47	U	+	> 0.5	Negativo	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TE, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT
	KpE49*	LBA	+	> 0.5	Negativo	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TE, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT
	KpE50*	H	+	> 0.5	Negativo	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TE, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT
LAB. CLÍNICO	KpLC9	F	+	> 5	Negativo	Sensible a los antibióticos
	KpLC10	F	+	> 5	Negativo	Sensible a los antibióticos
	KpLC19	F	+	> 5	Negativo	Sensible a los antibióticos
HNP	KpN24	LP	+	> 5	Negativo	CZ

(Tomado de Pérez-Sánchez et al., 2021) *Cepas aisladas del mismo paciente. U: urocultivo, LBA: lavado bronco alveolar, H: hemocultivo, F: faringe, LP: líquido de pleura, CZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, TE: tetraciclina, GM: gentamicina, CIP: ciprofloxacino, LVX: levofloxacino, NOR: norfloxacino, NAL: ácido nalidíxico, CL: cloranfenicol, SXT: trimetoprim con sulfametoxazol, NN: trobamicina. HNP: Hospital Para el Niño Poblano.

5 JUSTIFICACIÓN

Klebsiella spp. es un importante patógeno oportunista causante de una amplia variedad de infecciones, la versatilidad que posee para formar parte de diferentes nichos ecológicos y adquirir genes de resistencia a antibióticos mediante elementos genéticos móviles, ha permitido su rápida adaptación en el ambiente hospitalario. De manera alarmante, se informa el surgimiento de cepas virulentas y que además son resistentes a múltiples antibióticos incluyendo carbapenémicos, por lo que emplear una terapia antibiótica eficaz se vuelve un gran desafío. En México, existen pocos estudios en los que se identifiquen genes relacionados con la virulencia y la resistencia a los antibióticos y si son movilizados mediante plásmidos en cepas de *Klebsiella* spp. causantes de infecciones hospitalarias y de la comunidad. Por lo que es importante determinar ambos mecanismos y el estudio de los plásmidos en cepas aisladas en la ciudad de Puebla.

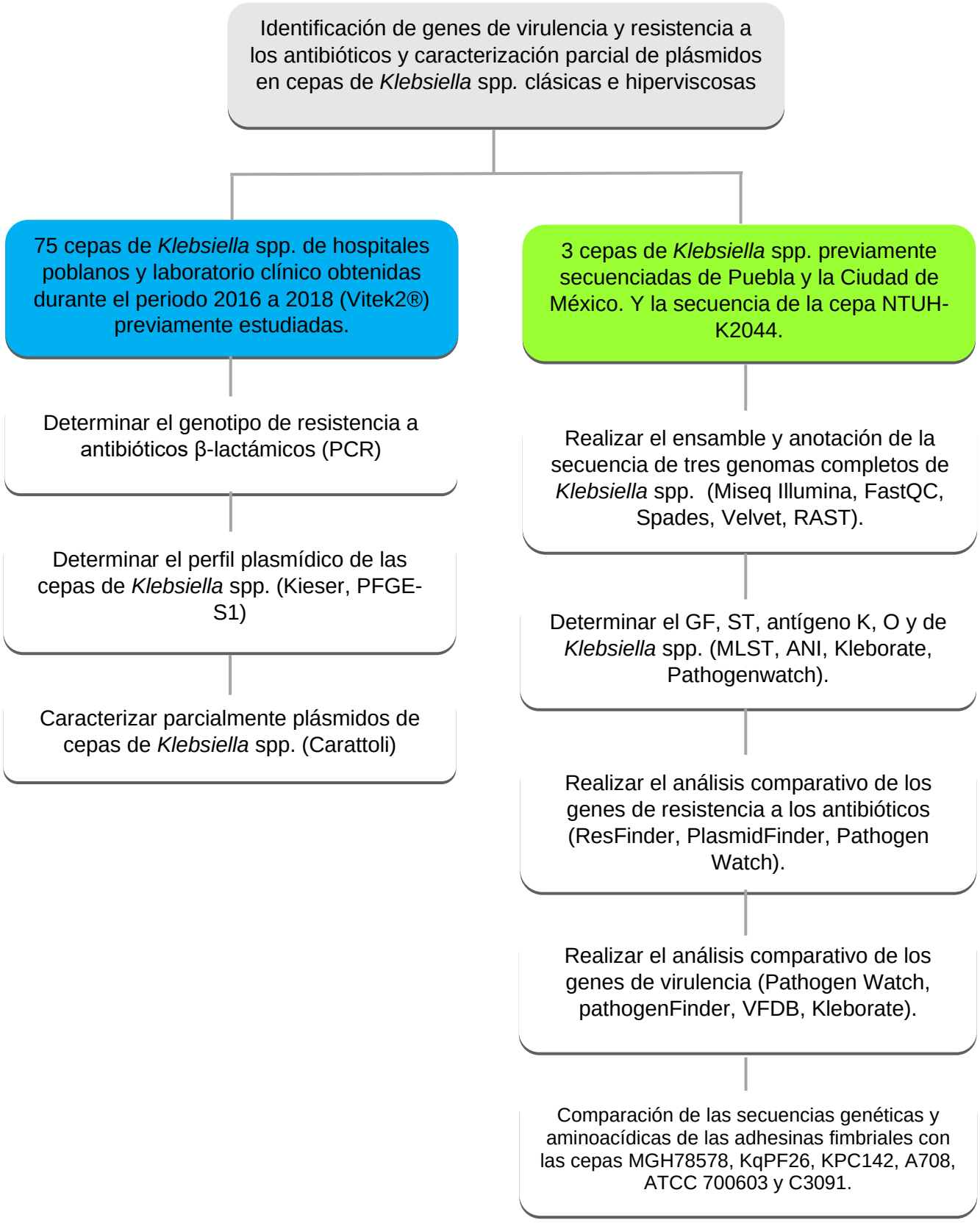
6 OBJETIVO GENERAL

Identificar genes de virulencia y resistencia a los antibióticos y caracterizar parcialmente plásmidos en cepas de *Klebsiella* spp. clásicas e hiperviscosas obtenidas de hospitales y la comunidad.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el genotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos de algunas cepas de *Klebsiella* spp.
2. Realizar el perfil de plásmidos de cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos.
3. Caracterizar parcialmente plásmidos de cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos.
4. Realizar un análisis comparativo de los genes de resistencia, virulencia y elementos genéticos móviles de tres genomas completos de *Klebsiella* spp.

7 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



8 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Estudio de las cepas de *Klebsiella* spp.

8.1.1 Datos de las cepas de *Klebsiella* spp.

Se trabajó con 75 cepas de *Klebsiella* spp. provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, Hospital para el Niño Poblano, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hospital de Especialidades I.S.S.S.T.E.P. “5 de mayo” y del Laboratorio clínico especializado “Los Ángeles” de la ciudad de Puebla durante el periodo que comprende enero del 2016 a diciembre del 2018 aisladas e identificadas previamente en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) por Pérez-Sánchez.

Las cepas se preservaron en crioviales con caldo BHI/Glicerol (10% v) (BIOXON ®) y antibiótico (CTX 4 µg/mL) en los casos que se requería. Se identificaron con número secuencial de acuerdo con el cepario interno del LMHyC.

8.1.2 Obtención de lisado bacteriano para PCR

Se empleó el método de lisis por calor. A partir de un cultivo puro, se tomó una colonia aislada, la cual se sembró en masivo en Agar Soya Tripticaseína (TSA), se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Se tomó una asada del crecimiento bacteriano y se colocó en un tubo de microcentrífuga el cual contenía 800 µL de SSI estéril, posteriormente se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó tres veces más con SSI estéril siguiendo el procedimiento anterior. Después de los lavados, la pastilla se re-suspendió con 800 µL de agua inyectable y se sometió a hervido en baño María durante 10 min con el fin de propiciar la ruptura celular y permitir la salida del material genético al medio acuoso; se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante se recuperó en un tubo de microcentrífuga estéril, se midió la concentración de ADN con NanoDrop™ 2000, para este procedimiento se utilizó la aplicación del espectrofotómetro, se seleccionó la opción de ácidos nucleicos e inmediatamente el equipo realiza un verificación

automática; se limpió el lector del equipo con papel y se procedió a leer un blanco con 2 µL de agua inyectable estéril, una vez que se activó la casilla (Measure), se procedió a la medición de los lisados, se fue limpiando el lector óptico con papel entre muestra y muestra para evitar contaminaciones. La lectura a 260 nm indica la concentración de ADN teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/mL de ADN de doble hebra. Los lisados que resultaron muy concentrados se diluyeron con agua inyectable estéril siguiendo la fórmula C1V1=C2V2 hasta ajustarlos a una concentración de 200 µg/mL. Y se conservaron a -20°C para su uso posterior. Estos lisado bacterianos se usaron para la amplificación de genes de resistencia a antibióticos β-lactámicos.

8.1.3 PCR de genes de resistencia a β-lactámicos

Se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final con los lisados bacterianos obtenidos a partir de algunas cepas de estudio para evidenciar la presencia de los genes: *bla*$_{SHV}$ (9 cepas), *bla*$_{TEM}$ (9 cepas), *bla*$_{CTX-M}$ (10 cepas), *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$ y *bla*$_{IMP}$ (9 cepas) que codifican para la resistencia a antibióticos β-lactámicos y de esta manera completar los resultados del genotipo de resistencia a antibióticos de las 75 cepas de estudio. En la tabla 3 se muestran los datos de los oligonucleótidos que se utilizaron, así como las condiciones de las reacciones de PCR para la amplificación de los genes de resistencia a antibióticos β-lactámicos y el tamaño del producto esperado. Se utilizó el termociclador T Professional TRIO Thermocycler (Biometra) para llevar a cabo las reacciones de PCR, las cantidades utilizadas de los reactivos se muestran en la tabla 4. Como controles se utilizaron las cepas de *E. coli* C4430 (*bla*$_{CTX-M}$ y *bla*$_{TEM}$), *K. pneumoniae* Kp003 (*bla*$_{SHV}$), *P. aeruginosa* PE52 (*bla*$_{IMP}$) y de *A. baumannii* AN54 (*bla*$_{NDM}$).

Los productos de PCR se verificaron en gel de agarosa al 1% y corrimiento electroforético en la cámara de electroforesis (BioRad®) con Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (100V/30min); después del corrimiento, los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) durante 15 segundos y se lavaron con agua destilada durante 10 min. Para obtener las imágenes de los geles, se utilizó el fotodocumentador de luz UV MiniBis Pro.

Tabla 3.- Condiciones de PCR y oligonucleótidos empleados para la amplificación de genes de resistencia a antibióticos β-lactámicos.

Gen	Oligonucleótidos	Desnaturalización inicial	Ciclos	Condiciones de reacción		Extensión final	Conservación final	Tamaño esperado	Referencia
bla SHV	SHV-1F (GGGTTATTCTTATTTGTCGCT) SHV-2R (TAGCGTTGCCAGTGCTCG)	96 °C/15 seg	24	Desnaturalización Alineamiento Extensión	96 °C/15 seg 52 °C/15 seg 72 °C/2 min	72 °C/3 min	10 °C ∞	883/930 pb	Mercier y Levesque, 1990
bla TEM	TEM1F (AGAGTATGAGTATTCAACATT) TEM2R (ATCTCAGCGATCTGTCTAT)	95 °C/3 min	35	Desnaturalización Alineamiento Extensión	95 °C/1 min 45 °C/1 min 72 °C/1 min	72 °C/10 min	10 °C ∞	837 pb	Hansen *et al*., 2004
bla CTXM-Universal	CTXM-Uni F (CGATGTGCAGTACCAGTAA) CTXM-Uni R (TTAGTGACCAGAATCAGCGG)	94 °C/5 min	35	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94 °C/30 seg 52 °C/30 seg 72 °C/1 min	72 °C/5 min	10 °C ∞	566 pb	Batchelor *et al*., 2005
bla KPC	blaKPC-F1 (ATGTCACTGTATCGCCGTCT) blaKPC-R2 (TTACTGCCCGTTGACGCCCA)	94 °C/5 min	30	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94 °C/1 min 55 °C/1 min 72 °C/1 min	72 °C/5 min	10 °C ∞	882 pb	Akpaka P *et al*., 1998
bla NDM	NDMv-F (AATATTATGCACCCGGTCGCG) NDMv-R (CATCACGATCATGCTGGCCTT)	94 °C/5 min	30	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94 °C/1 min 54 °C/1 min 72 °C/1 min	72 °C/10 min	10 °C ∞	732 pb	López *et al*., 2012
bla IMP	IMPd-F (CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG) IMPd-R (GCCADGCTACDANATTTGCGTC)	94 °C/5 min	30	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94 °C/1 min 56 °C/1 min 72 °C/1 min	72 °C/10 min	10 °C ∞	515 pb	López et al., 2012

Tabla 4.- Elementos y cantidades utilizadas para las reacciones de PCR.

Reactivos para 1 reacción	Concentración inicial	Cantidad adicionada	Concentración final
Agua estéril	-	6.12 µL	-
Buffer de reacción NH_4 (Invitrogen®)	10 X	1 µL	1 X
$MgCl_2$ (Thermo Scientific ®)	25 mM	1 µL	2.5 mM
dNTPs Mix (Sigma Aldrich®)	2.5 mM	0.2 µL	0.05 mM
Oligonucleótido "Forward"	25 µM	0.3 µL	0.75 µM
Oligonucleótido "Reverse"	25 µM	0.3 µL	0.75 µM
Taq DNA polimerasa (Invitrogen®)	5 U/µL	0.08 µL	0.4 U/µl
Lisado de ADN	200 ng/µL	1 µL	20 ng/µL
Total	-	10 µL	-

8.1.4 Extracción de plásmidos por el método de Kieser

Las cepas con fenotipo de resistencia a antibióticos carbapenémicos (KpE8, KoE9, KoE37, KoE51, KpS1, KpS2, KpS3, KpS5, KpN29) y a una cepa control de *E. coli* (NCTC 50192) se les realizó la extracción de plásmidos por el método de Kieser (Kieser, 1984) como se menciona a continuación. A partir de un cultivo puro, se tomó una colonia aislada la cual se sembró en masivo en agar TSA y se incubó durante

18-24 h a 37 ºC, se tomó una asada del crecimiento bacteriano y se colocó en un tubo de microcentrífuga el cual contenía 1 mL de SSI estéril, se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y se adicionaron 400 µL de solución 1, la pastilla se suspendió suavemente con una pipeta. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de lisozima (0.0003 g/100 µL) y se invirtió suavemente para mezclar. Se dejó incubar en hielo durante 30 minutos.

Los tubos se sacaron del hielo y se les adicionó 250 µL de solución II, se mezcló por inversión, se incubó por 30 minutos a 55 ºC y se dejó enfriar en agua por 5 minutos. Después, se agregaron 80 µL de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) de Invitrogen® y se mezcló por vórtex hasta que se tornó en una coloración blanca uniforme. Se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 20 minutos y del sobrenadante se recuperaron 400 µL.

Se tomaron 5 µL para cargarlos en un gel de agarosa al 0.7%, el corrimiento electroforético se realizó en la cámara de electroforesis (BioRad®) con TAE 1X (100V/1 h 40 min), después del corrimiento, el gel se tiñó con BET durante 30 segundos y se lavó con agua destilada durante 20 min. Para obtener las imágenes de los geles, se utilizó el fotodocumentador de luz UV MiniBis Pro.

8.1.5 Determinación de número y tamaño de plásmidos

8.1.5.1 Electroforesis en gel de campos pulsados

Se llevaron a cabo ensayos de digestión de ADN total mediante la técnica Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) y el uso de nucleasa S1, con la finalidad de conocer el número y tamaño de los plásmidos presentes en las cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos (Gautom *et al*., 1997; Ruiz *et al*., 2012). La preparación de los insertos, la lisis bacteriana y el lavado de los insertos se realizó tal como se describe en la Tesis de Doctorado de Gerardo Cortés Cortés con modificaciones en el tiempo de lisis bacteriana y en las cantidades de agua inyectable y buffer TE utilizados en lavado de insertos, como se indica a continuación:

8.1.5.2 Preparación de los insertos:

A partir de un cultivo puro, se tomó una colonia aislada la cual se sembró en masivo en agar BHI y se incubó durante 18-24 h a 37 ºC, se tomó una asada del crecimiento bacteriano y se colocó en un tubo de microcentrífuga el cual contenía 800 µL de SSI estéril, se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó tres veces más con SSI estéril. Posteriormente, se tomó una asada de la pastilla y se suspendió en un tubo con 1 mL de Buffer SE (75mM NaCl y 25mM EDTA, pH 8) y se ajustó la turbidez a 4 en la escala de McFarland. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1.5% en tampón TE (10mM Tris y 1mM EDTA) y se mantuvo a 54ºC. Se mezclaron 0.5 mL de la suspensión bacteriana con 0.5 mL de agarosa y se distribuyó en moldes (insertos). Se dejó solidificar 10 minutos en refrigeración (4 ºC)

8.1.5.3 Lisis bacteriana:

Se emplearon 3 insertos por cepa, a los que se añadieron 1 mL de Buffer de lisis [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)] y se dejó incubar durante 18 h en baño María a 54ºC.

8.1.5.4 Lavado de los insertos:

Tras eliminar el Buffer de lisis, se realizaron los siguientes lavados en baño María a 54ºC, agregando:

- 10 ml de agua inyectable cada 10 min, tres veces.
- 7 ml de Buffer TE cada 10 min, dos veces.
- 7 ml de Buffer TE a temperatura ambiente, una vez.

Los insertos se conservaron en 1 mL de Buffer TE a 4ºC hasta su utilización.

8.1.5.5 Digestión enzimática:

Para la digestión con la enzima S1, se utilizó medio inserto de cada cepa. El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µL por tubo, a los que se añadieron 160

U/µL de enzima S1 (Fermentans Thermo Scientific®), 20 µl de Buffer 5X de la enzima y agua inyectable. Se incubó por 40 min a temperatura ambiente.

Reacción:	Enzima S1:	1.6 µl
	Buffer 5X:	20 µl
	Agua:	78.4 µl
	Volumen Final:	100 µl

Transcurridos los 40 min de incubación, la digestión se detuvo colocando el inserto en un tubo con 150 µL de EDTA 0.5M y sarcosil (N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck®) al 1% e incubando en hielo durante 10 min. Posteriormente, los insertos se cargaron en el gel de agarosa al 1.2%, procurando quitar el exceso de sarcosil con papel absorbente. En el primer y último pozo del gel se colocó un inserto de la cepa control *E. coli* NCTC 50192, debido a que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido: 154, 66, 48 y 7 kb (Philippon, *et al*., 1997).

8.1.5.6 Electroforesis:

Se realizó en la cámara CHEF-DR II (BioRad) con 3 L de Buffer Tris-Acetato-EDTA (TBE) 0.5X suplementado con tiourea 75µM (0.5g/L, Merck®). El gradiente de voltaje fue 6 V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 segundos durante 22 h. a 14 ºC. El gel se tiñó durante 1 min en una solución acuosa de 200 mL de BET [10 µl del stock/ 200 mL], se lavó en agua tridestilada durante 30 minutos y se digitalizó en el fotodocumentador de luz UV MiniBis Pro.

8.1.6 Caracterización parcial de plásmidos por “PCR-based replicon typing”

A las cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos también se les realizó la caracterización parcial de plásmidos, por lo cual se utilizó el esquema de tipificación por medio de la amplificación de replicones mediante PCR de acuerdo con el método descrito por Carattoli y colaboradores, denominado “PCR-based replicon typing” (PBRT) (Carattoli *et al*., 2005). Este método está dirigido para las principales familias de plásmidos de la familia *Enterobacteriaceae.* Es decir, mediante la amplificación

por PCR de los replicones pertenecientes a los grupos de incompatibilidad (Inc), donde la incompatibilidad se define como la incapacidad de dos plásmidos relacionados para propagarse de manera estable en la misma línea celular (Carattoli *et al*., 2009). Para llevar a cabo este método es necesario realizar 5 PCR múltiplex y 3 simplex (aquí solo se realizaron las 5 PCR múltiplex y 2 PCR simplex: IncK e IncB/O). A continuación, se describen los oligonucleótidos utilizados y sus características. De igual forma, se buscaron otros replicones descritos por García-Fernández *et al*., 2009, que también se incluyen en la tabla 5.

Tabla 5.- Oligonucleótidos utilizados para la caracterización parcial de plásmidos por el método PBRT.

Grupo Inc	Secuencias de oligos (5´→3´)	Sitio blanco	Amplicón (pb)	Referencia
IncHI1[1]	IncHI1-F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC IncHI1-R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	parA-parB	471	
IncHI2[1]	IncHI2-F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC IncHI2-R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	Iterones	644	
IncI1[1]	IncI1-F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA IncI1-R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	RNAI	139	
IncX[2]	IncX-F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT IncX-R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	ori γ	376	Carattoli *et al*., 2005
IncL/M[2]	IncL/M-F: GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG IncL/M-R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	repA, B, C	785	
IncN[2]	IncN-F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG IncN-R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	repA	559	
IncFIA[3]	IncFIA-F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG IncFIA-R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	Iterones	462	
IncFIB[3]	IncFIB-F: TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC IncFIB-R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	repA	683	Villa *et al*., 2010
IncW[3]	IncW-F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG IncW-R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	repA	242	
IncY[4]	IncY-F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG IncY-R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT	repA	765	
IncP[4]	IncP-F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA IncP-R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	Iterones	534	Carattoli *et al*., 2005
IncFIC[4]	IncFIC-F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG IncFIC-R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	repA2	262	
IncA/C[5]	IncA/C-F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA IncA/C-R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	repA	465	
IncT[5]	IncT-F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT IncT-R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	repA	750	
IncFII[5]	IncFII-F: CTGATCGTTTAAGGAATTTT IncFII-R: CACACCATCCTGCACTTA	repA	258-262	Villa *et al*., 2010
IncK[a]	IncK/B-F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC IncK-R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	RNAI	160	Carattoli *et al*., 2005
IncB/O[b]	IncK/B-F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC IncB/O-R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	RNAI	159	
IncR	IncR-F: TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC IncR-R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	Plásmido R	251	García-Fernández *et al*., 2009
IncU	IncU-F: TCACGACACAAGCGCAAGGG IncU-R: TCATGGTACATCTGGGCGC	Plásmido U	843	
IncCoIETp	oricolE-F: GTTCGTGCATACAGTCCA oricolETp-R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	Plásmido CoIETp	106	

[1]: Multiplex 1; [2]: Multiplex 2; [3]: Multiplex 3; [4]: Multiplex 4; [5]: Multiplex 5.
[a]: Simplex 2; [b]: Simplex 3.

Las condiciones de amplificación para las PCR fueron iguales y se muestran en la tabla 6, mientras que las cantidades de los reactivos utilizados para las PCR múltiplex se describen en la tabla 7 y para las PCR simplex en la tabla 8.

Tabla 6.- Condiciones de PCR para la caracterización parcial de plásmidos por el método PBRT.

Desnaturalización inicial	Ciclos	Condiciones		Extensión final	Conservación final
94 °C/5 min	30	Desnaturalización Alineamiento Extensión	94 °C/1 min 60 °C/30 seg 72 °C/1 min	72 °C/5 min	10 °C ∞

Tabla 7.- Elementos y cantidades utilizadas para las PCR múltiplex.

Reactivos para 1 reacción	Concentración inicial	Cantidad adicionada	Concentración final
Agua estéril	-	5.2 µL	-
Buffer de reacción NH_4 (Invitrogen®)	10 X	1 µL	1 X
$MgCl_2$ (Thermo Scientific ®)	25 mM	1 µL	2.5 mM
dNTPs Mix (Sigma Aldrich®)	10 mM	0.4 µL	0.4 mM
Oligonucleótido "Forward"	25 µM	*0.3 µL	0.75 µM
Oligonucleótido "Reverse"	25 µM	*0.3 µL	0.75 µM
Taq DNA polimerasa (Invitrogen®)	5 U/µL	0.1 µL	0.5 U/µl
Lisado de ADN	200 ng/µL	0.5 µL	5 ng/µL
Total	-	10 µL	-

*Cada uno de los oligonucleótidos (3 pares).

Tabla 8.- Elementos y cantidades utilizadas para las PCR simplex.

Reactivos para 1 reacción	Concentración inicial	Cantidad adicionada	Concentración final
Agua estéril	-	6.4	-
Buffer de reacción NH_4 (Invitrogen®)	10 X	1 µL	1 X
$MgCl_2$ (Thermo Scientific ®)	25 mM	1 µL	2.5 mM
dNTPs Mix (Sigma Aldrich®)	10 mM	0.4 µL	0.4 mM
Oligonucleótido "Forward"	25 µM	0.3 µL	0.75 µM
Oligonucleótido "Reverse"	25 µM	0.3 µL	0.75 µM
Taq DNA polimerasa (Invitrogen®)	5 U/µL	0.1 µL	0.5 U/µl
Lisado de ADN	200 ng/µL	0.5 µL	5 ng/µL
Total	-	10 µL	-

8.1.7 Oligonucleótidos seleccionados para la amplificación de genes de virulencia.

Como parte del proyecto inicial en el cual se pretendía buscar algunos genes de virulencia reportados de cepas hvKp, se realizó una búsqueda en la bibliografía de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de virulencia: *iucA, rmpA2, kfuBC, wcaG* y *allS*. Así como, genes que codifican para antígenos capsulares presentes en cepas hipervirulentas: K1, K2 y K5.

Una vez que se realizó la búsqueda de los oligonucleótidos antes mencionados, se obtuvieron secuencias del Genbank y se realizaron alineamientos múltiples de cada uno de los genes de interés con ayuda de la herramienta Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y posteriormente, se verificó que los oligonucleótidos reportados fueran complementarios con el conjunto de genes obtenidos de la base de datos.

A continuación, se mencionan los nombres y el número de acceso de las cepas que se utilizaron para los alineamientos de cada uno de los genes.

- K1: L22 (CP031257.1); 1084 (CP003785.1); 2e (CP028478.1); KUH-KPNHVL1 (CP047675.1); (AB355924.1).
- K2: KC-PI-HB1 (CP030923.1); Kpn2166 (LR745045.1); SMU18037509 (CP045661.1); NCTC13635 (LR134162.1); CRK0298 (CP034039.1); 18CPO060 (CP034778.1).
- K5: E5051 (AB289645.1); R50 (CP040363.1); GN-2 (CP019160.1); (LT174568.1); Ecol_422 (CP018962.1).
- *iucA*: WSD411 (CP045675); NTUH-K2044 (AP006726.1); TK421 (CP045692.1); KpvK54 (CP023135.2).
- *rmpA2*: BA6740 (MK649825.1); Kpn2166 (LR745046.1); NIBSAC (AY059954.1); KP19-2029 (CP047160.1); BA34918 (CP036191.1); Kp36 (CP047193.1); BA4656 (CP035906.1); WCHKP020030 (CP028791.1); KUH-KPNHVL1 (CP047676.1); 847 (AY059956.1); WSD411 (CP045675.1).

- *KfuBC*: BD_DM_782 (CP046381.1); LEMB11 (CP045783.1); 15WZ-82 (CP032354.1); 11420 (CP026023.1); (AB115591.2); DA12090 (CP030072.1); 13450 (CP026013.1); CP010523.2 (CP010523.2); QMP B2-170 (CP031798.1); FDAARGOS_629 (CP044047.1); 234-12 (CP011313.1).
- *wcaG*: L22 (CP031257.1); 11420 (CP026023.1); KP7 (CP025088.1); NTUH-K2044 (AB117611.1); C2 (CP042520.1); NTUH-KP35 (AB289650.1); DA12090 (CP030072.1); 2069/49 (AB742228.1).
- *allS*: KPN1344 (CP033901.1); A708 (CP026368.1); YH43 (AP014950.1); NCTC9170 (LR588411.1); 7071295 (LR607330.1); 7387758 (LR607358.1); PO552 (CP037441.1); (AB115590.1); CP026023 (CP026023.1); ST23 (CP037742.1).

Después de realizar los alineamientos de las secuencias de los genes, tres de ellos (*kfuBC, wcaG, allS*) tenían reportados variantes nuevas, por lo que se modificaron los oligonucleótidos para abarcar las variantes reportadas. En la tabla 9, se muestran las características de los oligonucleótidos seleccionados, los cuales fueron enviados a sintetizar a ADN SINTÉTICO SA PI DE CV (T4-oligo) y se encuentran en resguardo en el LMHyC, pero ya no fue posible llevar a cabo la estandarización de las condiciones de PCR.

Tabla 9.- Oligonucleótidos para la determinación de genes de virulencia de *Klebsiella* spp.

Primer	Secuencia	Longitud	Tm	% G-C	Temperatura de alineamiento °C	Tamaño (bp)	Gen	Referencia
K1-F	GGTGCTCTTTACATCATTGC	20	56.4	45	60	1283		Rodriguez-Zolueta *et al*., 2013
K1-R	GCAATGGCCATTTGCGTTAG	20	58.4	50				
K2-F	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG	25	64.1	44	60	641	*K1, K2, K5* (antígeno capsular)	Shon *et al*., 2013
K2-R	CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	27	63.7	37				
K5-F	TGGTAGTGATGCTCGCGA	18	56.3	56	60	276		
K5-R	CCTGAACCCACCCCAATC	18	58.4	61				
iucA-F	AATCAATGGCTATTCCCGCTG	21	59.5	48	58	239	*iucA* (Aerobactina)	Brisse *et al*., 2014
iucA-R	CGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG	24	65.2	50				
rmpA2-F	CTTTATGTGCAATAAGGATGTT	22	54.7	32	60	450	*rmpA2* (Regulador de la cápsula)	Long *et al*., 2018
rmpA2-R	CCTCCTGGAGAGTAAGCATT	20	58.4	50				
kfuB-F	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	20	60.5	55	48	797	*kfuBC* (Sideróforo)	Modificado de Garza-Ramos *et al*., 2018
kfuC-R	TTTCRTGTGGCCAGTGRCTC	20	58.4 a 62.5	50-60				
wcaGF	GGTTGGKTCAGCWATCGTA	19	55 a 57.5	47 a 53	65	169	*wcaG* (Síntesis de fucosa)	Modificado de Turton *et al*., 2010
wcaGR	ACTATTCCGCCAACTTTTGC	20	56.4	45				
336F2	TCTGATTTAWCCCACATT	18	46.9	33	48	1091	*allS* (allantoinasa)	Modificado de Garza-Ramos *et al*., 2018
1416R	CCGTTAGGCAWTCCAGAC	18	56.3	56				

8.2 Secuenciación masiva de tres cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Debido a la contingencia sanitaria por la pandemia del SARS-COV-2, el protocolo de investigación sufrió algunas modificaciones, las cuales consistieron en analizar las secuencias del genoma completo de tres cepas de *Klebsiella* spp, las cuales fueron secuenciadas por Bello-López en un trabajo previo por medio de Secuenciación Masiva de Genomas (WGS), sin embargo en este trabajo se realizó el ensamble, la verificación de la calidad de las lecturas y las secuencias, la anotación y el análisis por diferentes herramientas bioinformáticas que se mencionarán más adelante (diagrama 1). A continuación, se muestra en la tabla 10 los datos de las tres cepas analizadas, su precedencia y características (N021, CM155 y CM175). En el caso del análisis de los genes de virulencia, se utilizaron como referencia las siguientes cepas: NTUH-K2044 (hvKp) (AP006725), MGH78578 (CP000647.1), KqPF26 (CP065838.1), KPC142 (CP023478.1), A708 (CP026368.1), ATCC 700603 y C3091 (EU682505.2) ya secuenciadas y reportadas en la base de datos del Genbank. Los datos de estas cepas se muestran en el ANEXO 14.1.

Diagrama 1.- Algoritmo de trabajo para el análisis de las secuencias de *Klebsiella* spp.

*: La cepa N021 se secuenció con la tecnología Illumina Miseq 2x75 pb, 5 millones de lecturas y las cepas CM155 y CM175 se secuenciaron con Illumina Miseq 2x150 pb, 5 millones de lecturas.

Tabla 10.- Datos de las cepas de *Klebsiella* spp. previamente secuenciadas

Procedencia	Cepa	Muestra	Fenotipo de resistencia a antibióticos	Genotipo de resistencia (PCR)	Mucosidad
HNP	N021	Hemocultivo	AM, PIP, ATM, CTX, FEP, CAZ, AMC, GM, S, AN, NN, CIP, TE, SXT	bla_{SHV}, bla_{TEM}	-
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre	CM155	Hemocultivo	AM, PIP, CAZ, CTX, FEP, ATM, GM, S, NN, TE, CL, SXT, AMC, CIP, MEM	$bla_{SHV-144}$, $bla_{CTX-M-15}$	+
	CM175	Catéter	AM, PIP, AMC, CAZ, CTX, FEP, ATM, NN, TE, SXT, MEM, AN, IMP	bla_{SHV-1}, bla_{OXA-1}, $bla_{CTX-M-15}$	+
Comunidad	NTUH-K2044 (AP006725)	Hemocultivo	N/A	*mdtG, norA, yceL, emrD, acrAB, macA, macB, oqxAB*	+

En la tabla se muestran las características de las 3 cepas de estudio y los datos de la cepa hvKp NTUH-K2044 que se tomó como referencia para la comparación de los genes de virulencia. AM: ampicilina AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, PIP: piperacilina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, MEM: meropenem, IMP: imipenem, TE: tetraciclina, CL: cloranfenicol AN: amikacina, GM: gentamicina, S: estreptomicina, NN: trobamicina, CIP: ciprofloxacino, SXT: trimetoprim sulfametoxazol, HNP: Hospital Para el Niño Poblano.

8.2.1 Análisis de calidad de las lecturas (FastQC)

Para el análisis de las secuencias se comenzó con el análisis de calidad de las lecturas mediante el programa FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/download.html#fastqc). El cual es una herramienta de lenguaje JAVA que a partir de los archivos FASTQ genera un reporte donde se puede tener acceso a diferentes métricas que evalúan la calidad de los siguientes datos obtenidos de la secuenciación:

- Calidad de la secuencia por base
- Calidad de la secuencia por mosaico
- Calificación de las calidades por secuencia
- Contenido de secuencias por base
- Contenido de GC por secuencia
- Contenido de N por base
- Distribución de las longitudes de la secuencia
- Niveles de duplicación de la secuencia
- Contenido de adaptadores

8.2.2 Ensamble de genomas con Spades 3.9 y Velvet 1.2.10

Después de que se realizó el análisis de calidad de las lecturas, es decir las secuencias del genoma producidas después de que fue fragmentado, posteriormente se realizó el ensamble de los fragmentos secuenciados con SPAdes 3.9 disponible en la Web en el Center for Genomic Epidemiology (https://cge.cbs.dtu.dk/services/SPAdes/). Por otra parte, el ensamble con Velvet 1.2.10 se obtuvo de PLACNETw (https://castillo.dicom.unican.es/upload/), finalmente se obtuvieron los archivos de salida de ambos ensambladores en formato FASTA. En el caso de SPAdes los archivos de entrada se encontraban en formato fastq, en la opción Sequencing Platform se seleccionó la opción Illumina – paired end reads. Mientras que para PLACNETw se subieron las lecturas en formato fastq.gz (paired end reads).

8.2.3 Evaluación de los ensambles

Se verificó que los ensambles obtenidos estuvieran correctos con la herramienta Quast, que permite evaluar diferentes parámetros de calidad para posteriormente realizar la anotación con RAST 2.0. Este paso es importante, ya que servirá para dar validez a los resultados obtenidos a partir de la secuencia. Los archivos de entrada fueron los obtenidos en formato FASTA y los archivos de salida se obtuvieron en formato de texto plano.

8.2.4 Anotación de las secuencias

Para realizar la predicción de genes se utilizó la herramienta Rapid Annotation using Subsystem Technology 2.0 (RAST) (https://rast.nmpdr.org/rast.cgi?page=Upload). Esta herramienta permite anotar genomas bacterianos completos o casi completos. Los archivos de entrada que se utilizaron fueron en formato FASTA, mientras que los archivos de salida utilizados fueron en formato Genbank y Spreadsheet (Excel XLS format).

En primer lugar, en la sección “File Upload: Sequences File” se seleccionó el archivo en formato FASTA obtenido del ensamble de la secuencia, posteriormente se seleccionó la opción “Use this data and go to step 2”, que nos dirigió a la página que muestra los datos del genoma. Después, se prosiguió a llenar una serie de datos sobre la taxonomía de *Klebsiella* spp. Una vez incluida esta información se seleccionó el botón “Use this data and go to step 3”. En esta sección se debe elegir una de las opciones para la canalización de anotaciones RAST, en este caso se eligió la opción RASTtk y los demás parámetros se dejaron como estaban por default y finalmente se seleccionó el botón “Finish the upload”. Al final, el programa asignó un número de acceso a nuestro trabajo y después de unas horas el “status” de la anotación cambió a “completado”, lo que indica que podemos descargar la anotación del genoma de interés.

8.2.5 Tipificación de las cepas

El ensamble de las secuencias se sometió a diferentes herramientas bioinformáticas para la tipificación de las cepas de estudio. Para la determinación de la ST se utilizó el programa Multi-Locus Sequence Typing (MLST 2.0) (https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/) disponible en la Web en el Center for Genomic Epidemiology, que toma como base los datos de perfil y secuencia de alelos MLST de PubMLST.org. Para el análisis de las 3 cepas de *Klebsiella,* se seleccionó la opción *Klebsiella pneumoniae* en la sección de “Select MLST configuration”. Después de disponer de las secuencias tipo de cada cepa, se utilizó el algoritmo eBURST, que divide un conjunto de datos MLST en grupos de aislados relacionados y complejos clonales (Feil *et al*., 2004) y con el software Phyloviz (https://www.phyloviz.net/goeburst/), se generó un gráfico con una solución óptima de la ubicación de los enlaces existentes entre las secuencias tipo de las cepas.

La determinación de la especie de las cepas se obtuvo del programa Pathogenwatch (https://pathogen.watch/), que además de la especie, permite obtener datos adicionales sobre las cepas como: MLST (http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/), locus K, locus O (https://github.com/katholt/Kleborate - version v2.0.4), genes de

resistencia (Kleborate, que utiliza la base de datos de CARD v1.0.0 https://card.mcmaster.ca/), grupos Inc de plásmidos (https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/) y genes de virulencia (Kleborate). Así mismo, para corroborar el género y especie se determinó la Identidad de nucleótidos promedio (ANI) (http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/), que indica que un porcentaje >95 corresponde a la misma especie. Las cepas que se utilizaron como referencia fueron representativas de las especies *K. pneumoniae* (CP040993.1), *K. quasipneumoniae* (CP023478.1) y *K. variicola* (CP054254.1), para estimar que dos cepas pertenecían a la misma especie, se tomó como referencia un ANI ≥ 96% (Brisse *et al*., 2014).

También se realizó la tipificación de los loci K y loci O de las cepas de *Klebsiella*, que codifican para la cápsula de polisacárido y el antígeno de lipopolisacárido O, respectivamente, con ayuda del programa Kaptive Web (http://kaptive.holtlab.net/), el cual permite cargar y analizar conjuntos de genomas completos.

8.2.6 Determinación de los genes de resistencia a antibióticos y plásmidos

Como se mencionó anteriormente Pathogenwatch (CARD v1.0.0) permite visualizar los genes de resistencia detectados en el genoma de las cepas; sin embargo, esta información también se corroboró con herramientas adicionales para la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos. La primera herramienta utilizada fue ResFinder 4.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) del Center for Genomic Epidemiology. En este caso se seleccionó la opción “Acquired antimicrobial resistance genes” de la especie *Klebsiella* y se especificó el tipo de lecturas “Assembled Genome/Contigs”, para posteriormente seleccionar el ensamble en formato FASTA.

Para la determinación de los grupos de incompatibilidad de las cepas se empleó la herramienta PlasmidFinder 2.1 del Center for Genomic Epidemiology (https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/), se seleccionó la familia *Enterobacteriaceae,* el umbral para el porcentaje mínimo de identidad fue del 95% con un porcentaje mínimo de cobertura del 60%. El tipo de lecturas seleccionado fue

“Assembled or Draft Genome/Contigs* (fasta) y se subió el ensamble en formato FASTA. También se realizó la búsqueda de otros elementos genéticos móviles que pudieran estar presentes en las cepas, por lo que se emplearon las bases de datos de ISfinder (https://www-is.biotoul.fr/index.php) y Mobile Element Finder v1.0.3 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/) para su determinación *in sílico.*

8.2.7 Determinación de genes de virulencia

La búsqueda de los genes de virulencia de *Klebsiella* se realizó con los programas bioinformáticos de PathogenFinder 1.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/PathogenFinder/), Virulence Factor Data Base (http://www.mgc.ac.cn/VFs/), Virulence Finder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/) y Bacterial analysis pipeline-batch upload (https://cge.cbs.dtu.dk/services/cge/). Así mismo, la búsqueda de los genes que codifican para fimbrias, sideróforos, reguladores de la síntesis de la cápsula y otros genes de virulencia se realizó de manera manual en el formato Spreadsheet (Excel XLS format) obtenido en la anotación con RAST de cada una de las cepas incluida la cepa: NTUH-K2044 (hvKp).

8.2.8 Comparación de las secuencias genéticas y aminoacídicas de las adhesinas fimbriales

Además de comparar los genes de virulencia encontrados en las cepas de estudio, se realizó una búsqueda adicional en diferentes fuentes bibliográficas acerca de los genes reportados que codifican para algunas adhesinas fimbriales estudiadas en *Klebsiella* spp. como: pili tipo I, pili tipo III y el pili tipo IV. Posteriormente, se descargaron de la base de datos del Genbank secuencias del genoma completo de cepas de *K. pneumoniae y K. quasipneumoniae.* Además de la cepa NTUH-K2044 que se utilizó en la comparación inicial, las cepas que se incluyeron fueron las siguientes: MGH78578, KqPF26, KPC142, A708, ATCC 700603 y C3091 con el fin de conocer las similitudes entre las secuencias de genes y aminoácidos de

adhesinas fimbriales de las cepas de estudio con respecto a las secuencias de genes y aminoácidos de las cepas seleccionadas para el análisis. Se realizaron alineamientos múltiples con Clustal Omega de los genes que codifican para las subunidades estructurales y reguladores transcripcionales, así como las secuencias de aminoácidos. Se plasmaron los locus de genes de cada una de las fimbrias y se buscaron dominios conservados en Pfam (http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1) y NCBI Conserved Domain (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi).

9 RESULTADOS

9.1 Resultados de las cepas de *Klebsiella* spp.

9.1.1 Genotipo de resistencia a los antibióticos

Con el objetivo de investigar el genotipo de resistencia a antibióticos β-lactámicos de las 75 cepas de *Klebsiella* spp. se realizó la búsqueda de los genes *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$ y *bla*$_{VIM}$ por medio del método de PCR punto final. En este trabajo se buscaron los genes *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$ a 9 cepas y *bla*$_{CTX-M}$ a 10 cepas. Con los resultados obtenidos por Pérez-Sánchez junto con los de este estudio, se logró completar la búsqueda de los genes de resistencia antes mencionados en las cepas de *Klebsiella* spp. Todas las cepas presentaron al menos uno de los genes de resistencia buscados e incluso algunas cepas presentaron combinaciones de estos genes (figura 2).

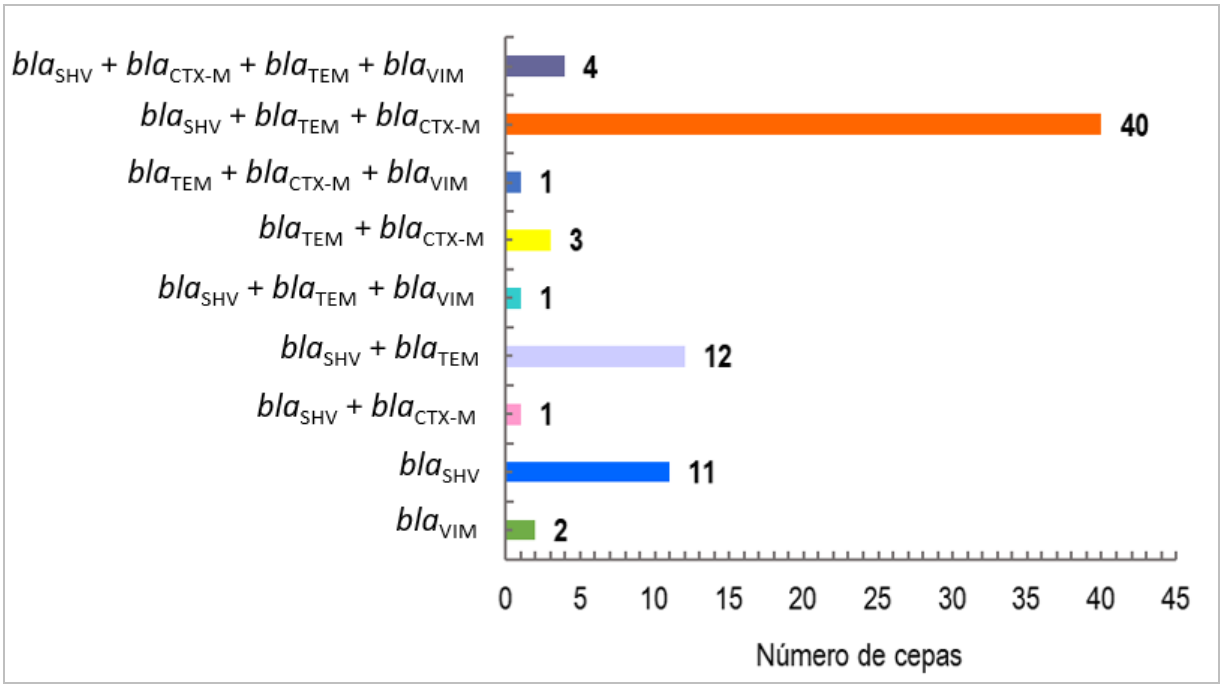


Figura 2.- Combinaciones de los genes de resistencia encontrados en las cepas 75 cepas de *Klebsiella* spp. de los hospitales ISSSTE, IMSS, HNP, ISSSTEP y LAB. CLINICO. Las cepas de este estudio presentaron al menos uno de los genes de resistencia buscados o combinaciones de ellos. Las cepas no portaron *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$ *y bla*$_{IMP}$.

Debido a la importancia del uso de los antibióticos carbapenémicos como tratamiento de las infecciones, se continuó únicamente con el estudio de estas cepas (KpE8, KpE9, KpE37, KpE51, KpS1, KpS2, KpS3, KpS5 y KpN29), a las cuales se les buscaron los genes que codifican para carbapenemasas, es decir, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$ y *bla*$_{VIM}$. Donde se obtuvo que, de las 9 cepas 8 portaron *bla*$_{VIM}$. Por lo que falta corroborar si la resistencia a carbapenémicos en la cepa KpE8 que no portó *bla*$_{VIM}$ posee otros genes que codifiquen para otras β-lactamasas que no se buscaron en este estudio o si se deba a otro mecanismo de resistencia.

9.1.2 Extracción plasmídica por el método de Kieser y PFGE-S1

Para investigar si las cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos contenían plásmidos o no, se realizó el método de Kieser, el cual es utilizado para plásmidos de bajo número de copias (alto peso molecular), que ya se encontraba estandarizado para *Klebsiella* spp. en el LMHyC.

En la figura 3a, se observa que las 9 cepas contienen plásmidos. Sin embargo, como en esta técnica no se obtienen los plásmidos linearizados, se realizaron digestiones con la nucleasa S1 mediante la técnica de PFGE con el objetivo de conocer el número y tamaño de estos.

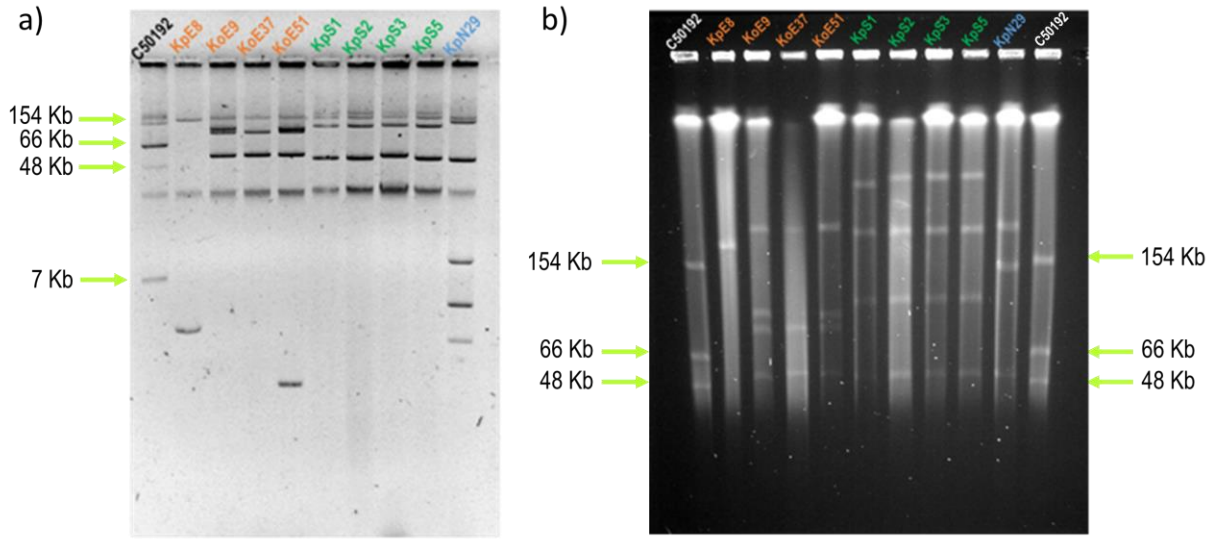


Figura 3.- a) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, de los productos de extracción de plásmidos por el método de Kieser de 9 cepas resistentes a carbapenémicos. b) PFGE-S1 de las 9 cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos. Las cepas provienen del Hospital ISSSTE (KpE8, KoE9, KoE37, KoE51), IMSS (KpS1, KpS2, KpS3, KpS5) y HNP (KpN29). Como cepa control se utilizó la *E. coli* NCTC 50192 (**C50192**).

En la figura 3b, se observa que las ocho cepas portadoras de *bla*$_{VIM}$ (KoE9, KoE37, KoE51, KpS1, KpS2, KpS3, KpS5 y KpN29), poseen entre 3 y 4 bandas plasmídicas. Mientras que en la cepa KpE8 que fue negativo para *bla*$_{VIM}$, solo se observó una sola banda. Aunque las cepas que portan *bla*$_{VIM}$ fueron aisladas de diferentes hospitales, parece haber al menos dos bandas que se conservan entre las cepas, una aproximadamente de 48 kb y otra mayor a 154 kb. Además, existe una concordancia con el número de bandas plasmídicas encontradas en el método PFGE-S1 con las obtenidas en el método de Kieser. Sin embargo, en la PFGE-S1 no se lograron apreciar bandas plasmídicas menores a los 48 Kb, que se encontraron en las cepas KpE8, KoE51 y KpN29 por el método de Kieser.

De manera adicional, se decidió realizar la extracción de plásmidos con el método de Kieser a 5 cepas seleccionadas de forma aleatoria que no fueran resistentes a carbapenémicos y así, verificar si contenían plásmidos o no. En la figura 4 se puede observar que las cepas seleccionadas poseen entre uno y tres bandas de plásmidos. A pesar de que estas cepas no son resistentes a carbapenémicos, si son MDR y se esperaba que portaran plásmidos.

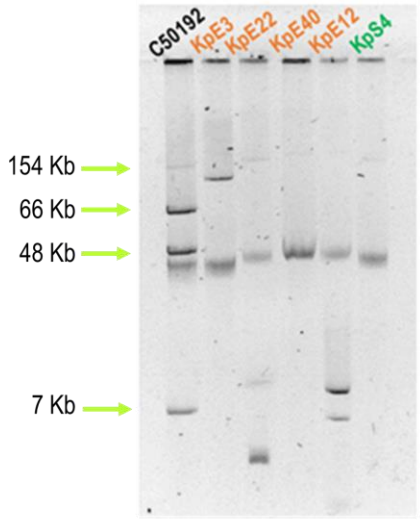


Figura 4.- Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, de los productos de extracción de plásmidos por el método de Kieser de 5 cepas sensibles a carbapenémicos. Las cepas provienen del Hospital ISSSTE (KpE3, KpE22, KpE40, KpE12) e IMSS (KpS4). Como cepa control se utilizó la *E. coli* NCTC 50192 (**C50192**).

9.1.3 PFGE con nucleasa S1 de las cepas hipermucoides

A las 9 cepas con fenotipo positivo de hiperviscosidad también se les realizó el perfil de plásmidos por medio de la PFGE-S1. 5 corresponden a cepas del hospital ISSSTE, 3 provienen del laboratorio Clínico y 1 del Hospital Para el Niño Poblano (HNP). Como se muestra en la figura 5, las cepas poseen entre 1 y 2 bandas plasmídicas, de las cuales solo las cepas que provienen del Hospital ISSSTE fueron cepas MDR. Estas 5 cepas portaron *bla*$_{SHV}$, y además las cepas KpE46, KpE47, KpE49 y KpE50 también fueron positivas para *bla*$_{CTX-M-15}$ y *bla*$_{TEM}$. Aunque las cepas del Laboratorio Clínico y del HNP no fueron MDR, también se encontraron los genes *bla*$_{SHV}$ y *bla*$_{TEM}$.

Lo que se pretendía realizar era hacer la caracterización de los plásmidos de estas cepas y buscarles genes de virulencia asociados con cepas hvKp, así como otros reguladores de la síntesis de la capsula reportados en plásmidos; sin embargo, solo se logró diseñar y obtener los oligonucleótidos (tabla 9), los cuales se encuentran en resguardo en el LMHyC, pero ya no fue posible llevar a cabo la estandarización de las condiciones de cada reacción de PCR.

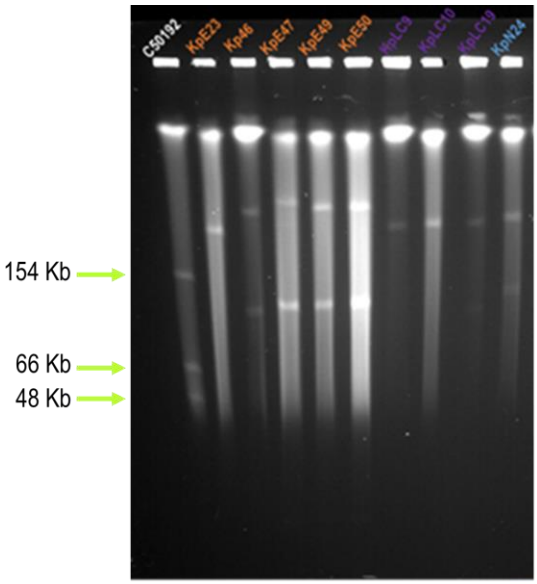


Figura 5.- PFGE-S1 de las 9 cepas hipermucoides. Las cepas provienen del Hospital ISSSTE (KpE23, Kp46, KpE47, KpE49 y KpE50), LAB. CLINICO (KpS1, KpS2, KpS3, KpS5) y HNP (KpN24). Como cepa control se utilizó la *E. coli* NCTC 50192 (**C50192**).

9.1.4 Caracterización parcial de plásmidos

Después de obtener el perfil plasmídico de las 9 cepas resistentes a carbapenémicos, se continuó con la caracterización parcial de plásmidos de estas cepas por el método de Carattoli que consistió en la amplificación de replicones mediante PCR. En la tabla 11, se muestra que la cepa KpE8 que no portó *bla*$_{VIM,}$ amplificó para IncFIC y CoelETp. Por otra parte, en las cepas KoE9, KoE37 y KoE51, se encontró IncY e IncFII. Con respecto a las cepas KpS1, KpS2, KpS3 y KpS5 aisladas del Hospital IMSS se puede observar que las 4 cepas amplificaron para IncFIA e IncFIC, mientras que en la cepa KpS1 también se encontró CoelETp. Por último, en la cepa KpN29 del Hospital para el Niño Poblano amplificó para IncY, IncFIC y también CoelETp.

Pérez-Sánchez se identifica a la variante *bla*$_{VIM-23}$ en las cepas KoE37 y KpS1 el cual también estaba asociado a un integrón de clase 1 en ambas cepas (Pérez-Sánchez, 2019). Esto último es importante debido a que fueron cepas aisladas de hospitales diferentes y además corresponden a especies distintas de *Klebsiella*.

Tabla 11.- Resultados de los grupos de incompatibilidad presentes en los plásmidos de 9 cepas de *Klebsiella* resistentes a antibióticos carbapenémicos.

Procedencia	PBRT		M1			M2			M3			M4			M5							
	Cepa	Genotipo	HI1	HI2	I1	L/M	N	X	FIA	FIB	W	P	Y	FIC	T	A/C	FII	K	B/O	CoelETp	R	U
ISSSTE	KpE8	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	KoE9	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{VIM}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	KoE37	*bla* $_{VIM-23}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	KoE51	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IMSS	KpS1	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM-23}$	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	KpS2	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	KpS3	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	KpS5	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HNP	KpN29	*bla* $_{VIM}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

PBRT: PCR-based replicon typing, M1: Multiplex 1; M2: Multiplex 2; M3: Multiplex 3; M4: Multiplex 4; M5: Multiplex 5.
HNP: Hospital Para el Niño Poblano.

En la tabla 12 se muestra un resumen de los resultados que se obtuvieron de las 9 cepas MDR y resistentes a carbapenémicos, los replicones que se encontraron y el número de bandas de cada una de las cepas.

Tabla 12.- Resumen de los resultados obtenidos de la caracterización parcial y el perfil plasmídico de 9 cepas resistentes a antibióticos carbapenémicos.

Cepa	Fenotipo de resistencia	Genotipo	Replicón	Número de bandas plasmidicas
KpE8	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, TE, AN, GM, TB, CIP, LVX, NOR, NAL, CHL, SXT	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$	FIC, CoelETp	1
KoE9	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, IMP, AN, GM, NN	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{VIM}$	Y, FIC	4
KoE37	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, MEM, IMP, NN	*bla* $_{VIM-23}$	Y, FIC	3
KoE51	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, IMP, AN, GM, NN	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	Y, FIC	4
KpS1	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, IMP, TE, GM, NN, CIP, SXT	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM-23}$	FIA, FIC, CoelETp	4
KpS2	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, IMP, TE, AN, GM, NN, CIP, SXT	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	FIA, FIC	4
KpS3	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, IMP, TE, GM, NN, SXT	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	FIA, FIC	4
KpS5	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, IMP, TE, GM, NN, CIP, NOR, SXT	*bla* $_{SHV}$, *bla* $_{TEM}$, *bla* $_{CTX-M}$, *bla* $_{VIM}$	FIA, FIC	4
KpN29	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, MEM, IMP, NN	*bla* $_{VIM}$	Y, FIC, CoelETp	3

AMC: ampicilina/ácido clavulánico, TZP: piperacilina/tazobactam, CZ: cefazolina, FOX: cefoxitina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, MEM: meropenem, IPM: imipenem, TE: tetraciclina, AN: amikacina, GM: gentamicina, NN: trobamicina, CIP: ciprofloxacino, LVX: levofloxacino, NOR: norfloxacino, NAL: ácido nalidixico, C: cloranfenicol, SXT: trimetoprim sulfametoxazol.

9.2 Resultados del análisis bioinformático de las cepas de estudio

Con motivo de la modificación del protocolo de investigación derivado de la contingencia sanitaria del COVID-19, se continuó con el análisis bioinformático de las secuencias del genoma completo de las cepas N021, CM155 y CM175. Estas fueron secuenciadas en un trabajo previo por Bello-López en el LMHyC debido al interés en el fenotipo y genotipo de resistencia, sin embargo, en este trabajo se realizó el ensamble de las secuencias, la verificación de la calidad de las lecturas, la anotación y el análisis de los genes de resistencia por medio de diferentes herramientas bioinformáticas. Además del enfoque del estudio de la resistencia a antibióticos, se realizó una búsqueda de los genes de virulencia presentes en las tres cepas de origen clínico y se hizo una comparación con los genes de virulencia presentes en una cepa hvKp (NTUH-K2044). Así como, la comparación de los genes de codifican para algunas adhesinas fimbriales presentes en las 3 cepas de estudio con los genes de las cepas MGH78578, KqPF26, KPC142, A708, ATCC 700603 y C3091.

9.2.1 Resultados del análisis de calidad de las lecturas (FastQC)

Con el objetivo de evaluar la calidad de los datos de secuenciación sin procesar, se utilizó la herramienta FastQC v0.11.9 para conocer si las lecturas obtenidas de la secuenciación tenían algún problema que pudiera afectar los análisis posteriores. Lo que se obtuvo fue que la calidad de las lecturas “paired end reads” de las 3 cepas fueron buenos, esto con base a los diferentes parámetros evaluados. Los resultados de este análisis se muestran en el ANEXO 14.2.

9.2.2 Resultados de la evaluación de los ensambles

Con el propósito de verificar que los ensambles obtenidos por medio de SPAdes 3.9 y Velvet 1.2.10 estuvieran correctos, se empleó la herramienta Quast, que permite evaluar la calidad de diferentes ensambles a la vez (Gurevich *et al*., 2013). Se obtuvo que la longitud de los ensambles fue de 5580353 pb para la cepa N021, 5403938 pb para CM155 y 5543958 pb para CM175. En el ANEXO 14.3, se muestran los datos obtenidos de la comparación entre los dos ensambladores utilizados. Para fines prácticos, se utilizó para la anotación y análisis posteriores el ensamble obtenido con SPAdes 3.9, debido a que con este ensamblador se obtuvo un solo archivo de salida, mientras que con Velvet 1.2.10 se obtuvo más de uno para cada una de las cepas.

9.2.3 Determinación de la especie y grupo filogenético

En un estudio anterior realizado en el LMHyC, se determinó por métodos experimentales que el grupo filogenético en las 3 cepas correspondía a KpI, esto con base a los patrones de restricción obtenidos a partir del gen *gyrA*. Sin embargo, por medio del análisis en Pathogenwatch se obtuvo que la cepa N021, correspondía a la especie *K. quasipneumoniae*. Por lo que se tuvo que corroborar la especie en esta cepa por medio de ANI, que permite estimar una media de valores de identidad o similitud entre fragmentos o dos secuencias genómicas (Goris *et al*., 2007). Para ello se tomaron del NCBI 3 cepas representativas de cada grupo filogenético. Para KpI se encuentran incluidas las subespecies de *K. pneumoniae*, para KpII la especie

representativa es *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* y *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* y para KpIII *K. variicola*. Lo que se determinó fue que al comparar la cepa N021 con una cepa de *K pneumoniae* dio un porcentaje de similitud del 93% y 92% con respecto a *K. variicola*. Mientras que, cuando se comparó con *K. quasipneumoniae*, se obtuvo un porcentaje del 96.32 % (Figura 7). Por lo tanto, correspondería a una cepa de *K. quasipneumoniae.* También se determinó el ANI de las cepas CM155 y CM175, los resultados se muestran en la figura 7, ambas corresponden al grupo filogenético KpI de la especie *K. pneumoniae*.

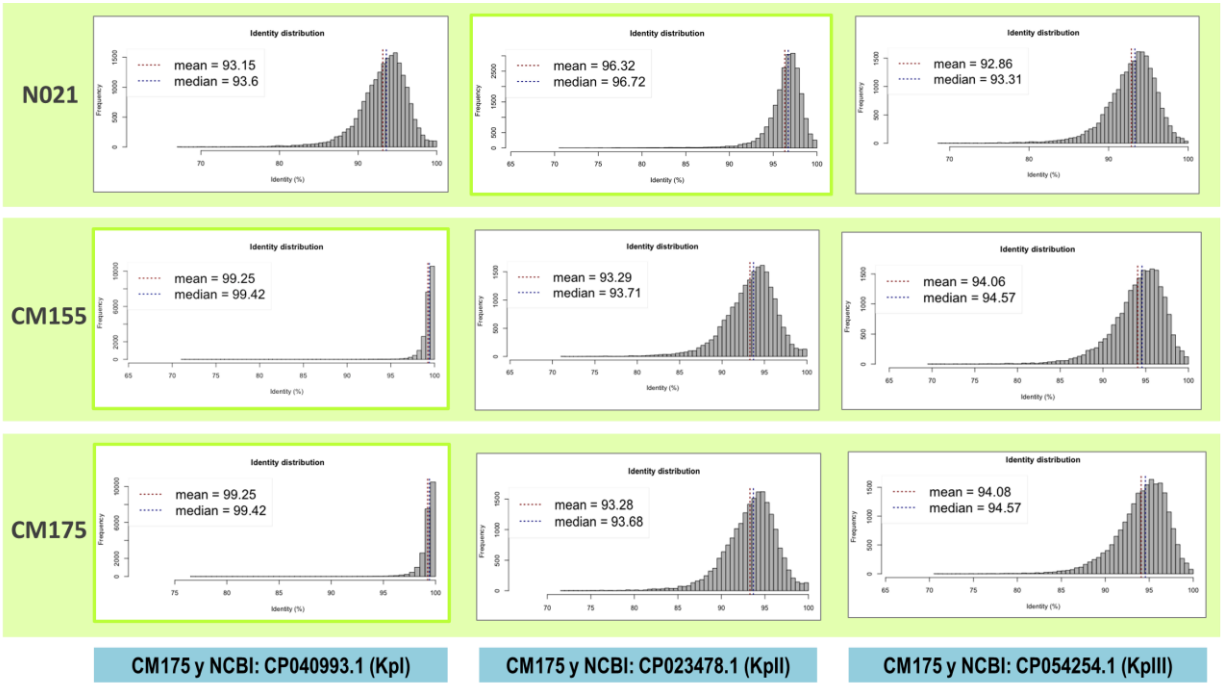


Figura 7.- Identidad de nucleótidos promedio (ANI) de las cepas N021, CM155 y CM175 con respecto a KpI, KpII y KpIII. Se determinó la especie en las 3 cepas mediante ANI, para estimar que dos cepas pertenecían a la misma especie, se tomó como referencia un ANI ≥ 96%. Las cepas que se utilizaron como referencia fueron especies de *K. pneumoniae* (CP040993.1), *K. quasipneumoniae* (CP023478.1) y *K. variicola* (CP054254.1).

9.2.4 Determinación de la Secuencia Tipo

Con el fin de realizar la determinación de la ST de las cepas, se utilizó el programa MLST, que permite hacer una tipificación bacteriana mediante la identificación de polimorfismos en la secuencia de nucleótidos de 7 genes “housekeeping” (Larsen *et al*., 2012). En la tabla 13 se muestra el resumen de la determinación de la especie, grupo filogenético y el ST. Las secuencias tipo a la que pertenecen estas cepas

fueron ST1542, ST867 y ST20, este último relacionado con el complejo clonal CG20, que forma parte de los linajes MDR, asociados a una mayor mortalidad (figura 8).

Tabla 13.- Tipificación de las cepas de *Klebsiella* spp.

Cepa	Grupo filogenético			ST
	Experimentalmente	WGS	Especie (ANI)	WGS
N021	KpI	KpII	*K. quasipneumoniae*	1542
CM155	KpI	KpI	*K. pneumoniae*	867
CM175	KpI	KpI	*K. pneumoniae*	**20**
NTUH-K2044	-	KpI	*K. pneumoniae*	23

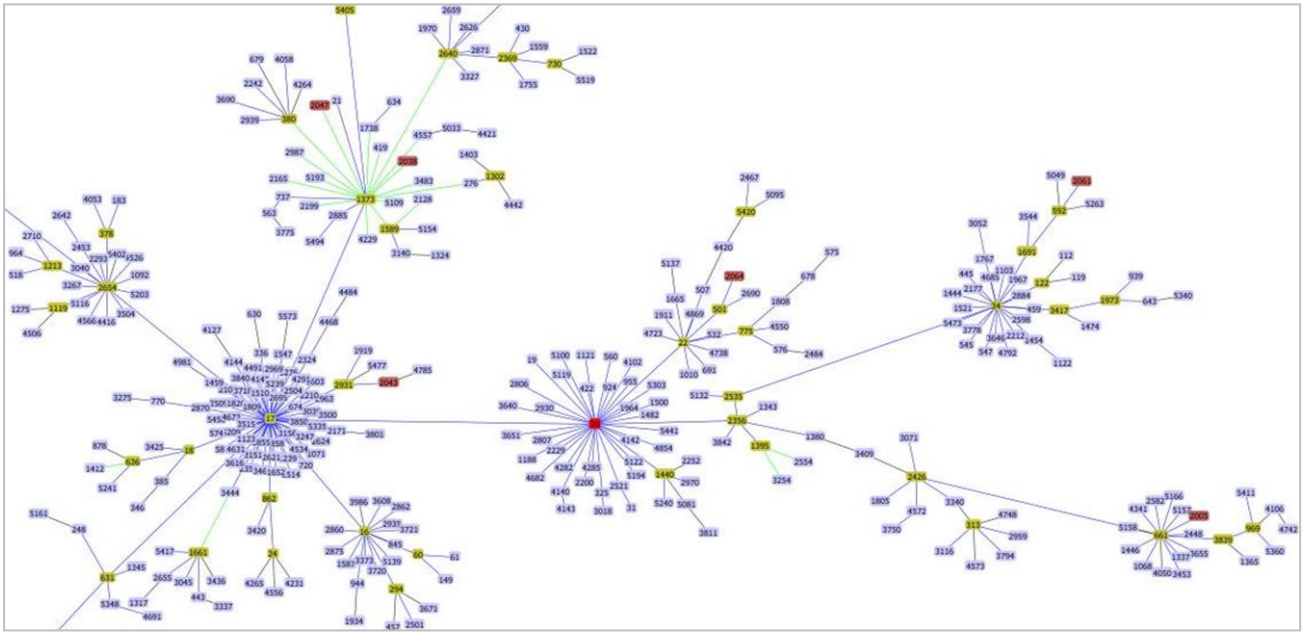


Figura 8.- Relación del ST20 de la cepa CM175, con el complejo clonal CG20 de los linajes MDR de *Klebsiella* spp. La relación del ST20 con el complejo clonal CG20 se determinó con el algoritmo eBURST y se generó un gráfico que muestra los enlaces existentes con la ST20 mediante el software Phyloviz.

9.2.5 Clasificación del locus K y O

Con el propósito de realizar la tipificación del antígeno K y el antígeno O de las 3 cepas de estudio, se utilizó la herramienta Kaptive Web que permite identificar los loci K y O presentes en los genomas bacterianos. Se obtuvieron tres locus K

distintos, estos fueron KL22, KL81 y KL28. En la figura 9 se observa que los genes en azul se conservan en las tres cepas, estos corresponden a genes que codifican para las enzimas de la síntesis de unidades repetidas o enzimas de transporte, mientras que los genes de diferentes colores son aquellos implicados en la biosíntesis de cada azúcar en particular. Donde los genes que codifican para la glicosil transferasa de iniciación que se ocupa en las tres cepas corresponde a *wcaJ*. Ninguno de los tres locus capsulares encontrados en las cepas, están relacionados con los reportados en las cepas hipervirulentas.

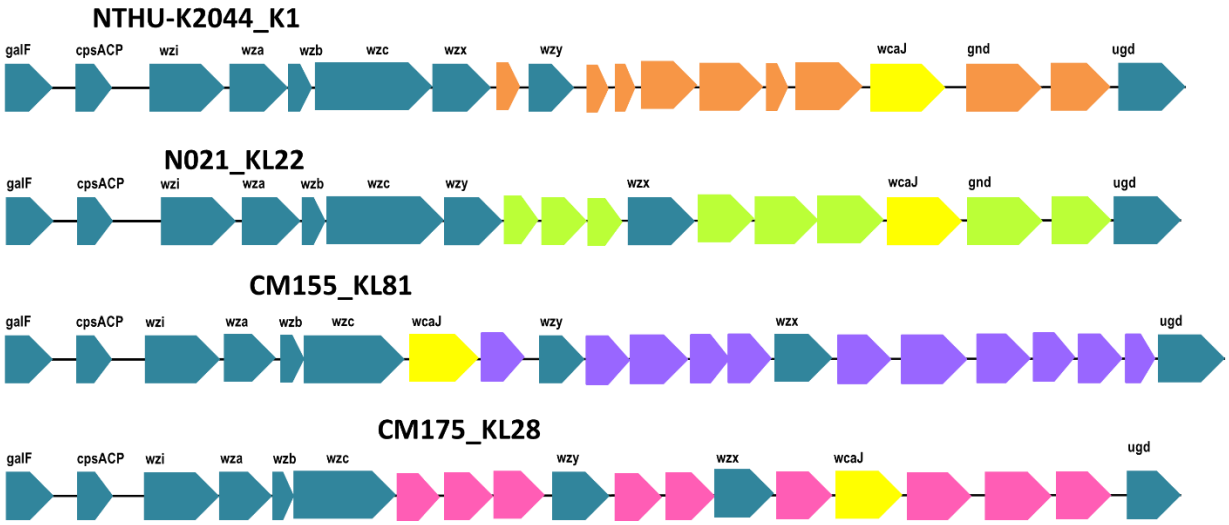


Figura 9.- Representación del locus K de las cepas de estudio y la cepa hvKp NTUH-K2044 obtenido con “Kaptive Web”. Se obtuvieron tres locus distintos, estos fueron KL22, KL81 y KL28 que no estan relacionados con cepas hvKp. Los genes conservados se muestran en color azul, que codifican para las enzimas de la síntesis de unidades repetidas o enzimas de transporte. En verde, morado y rosa se observan los genes implicados en la síntesis del polisacárido y en amarillo se señala a *wcaJ* que codifica para una glicosil transferasa de iniciación.

La determinación de la predicción del locus O mostró que las tres cepas contenían genes que codifican para un antígeno O distinto, siendo O5, OL101 y O1v2. En los tres locus se conservan los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de unidades repetidas y las implicadas en el transporte a través de la membrana. Los genes que cambian son aquellos involucrados en la síntesis de los polisacáridos que están representados con diferentes colores (figura 10). La cepa N201, contiene genes que codifica para azúcares de manosa, en la cepa CM155 de rafnosa y en CM175 de galactano. Se puede observar que de acuerdo con la

predicción realizada con Kaptive Web, la cepa CM155 no contiene el locus completo de OL101, ya que están ausentes los genes *rfbB* y *rfbC* que codifican enzimas de la biosíntesis de azúcares.

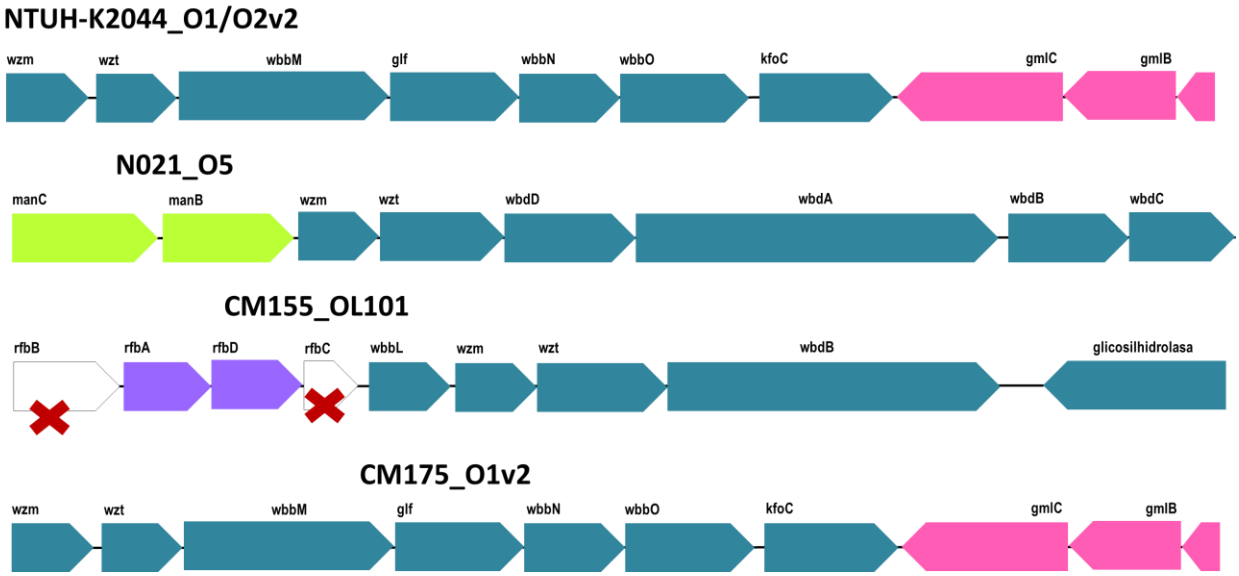


Figura 10.- Representación del locus O de las cepas de estudio y la cepa hvKp NTUH-K2044 obtenido con "Kaptive Web". Se encontraron los locus O de O5, OL101 y O1v2. En los tres locus se conservan los genes que codifican para las enzimas de la síntesis de unidades repetidas y en el transporte a través de la membrana (azul). Los genes en color verde, morado y rosa están involucrados en la síntesis de los polisacáridos. No se encontró el locus completo de OL101 en la cepa CM155.

9.2.6.1 Genotipo de resistencia a antibióticos

Para investigar el genotipo de resistencia a los antibióticos de las cepas se utilizó ResFinder 4.1 y CARD v1.0.0. El análisis de los genes de resistencia mostró lo siguiente: se pudo corroborar los resultados obtenidos experimentalmente, con los obtenidos en la secuenciación, con excepción del gen *bla*$_{SHV}$ de la cepa N021, aquí se identificó como *bla*$_{OKP-A5}$, que es un gen ortólogo de *bla*$_{SHV}$ reportado en *K. quasipneumoniae*. Como se muestra en la Figura 11, las cepas también portan más de una β-lactamasa; la cepa N021 contenía a *bla*$_{TEM-1B}$, mientras que en las cepas CM155 y CM175 se encontró a *bla*$_{CTX-M-15}$. Únicamente en la cepa CM175 estuvo presente la *bla*$_{OXA-1}$ y *aac6-Ib-cr*. En la cepa N021 también se encontró a los genes de resistencia a aminoglucósidos *apH3-Ib* y *apH6-I*. Las 3 cepas contenían un gen de

resistencia a cloranfenicol distinto y además un gen *fosA* que puede conferir resistencia a fosfomicina. Solo en la cepa CM155 se encontró el gen *qnrB2* que está implicado en la resistencia a fluoroquinolonas. Así mismo, se encontraron en las cepas los genes de resistencia a sulfonamidas y trimetoprim: *sul1, sul2 y drfA25*.

Se corroboró en todos los casos la cobertura del gen y su porcentaje de identidad de las secuencias, donde el único gen que tuvo un porcentaje de identidad menor fue el gen *fosA* en las 3 cepas. Por esta razón se recabaron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la familia fos, que incluye un total de 29 variantes descritas. Se obtuvo que *fosA* de las cepas de estudio fueron variantes distintas a las reportadas actualmente (figura 12).

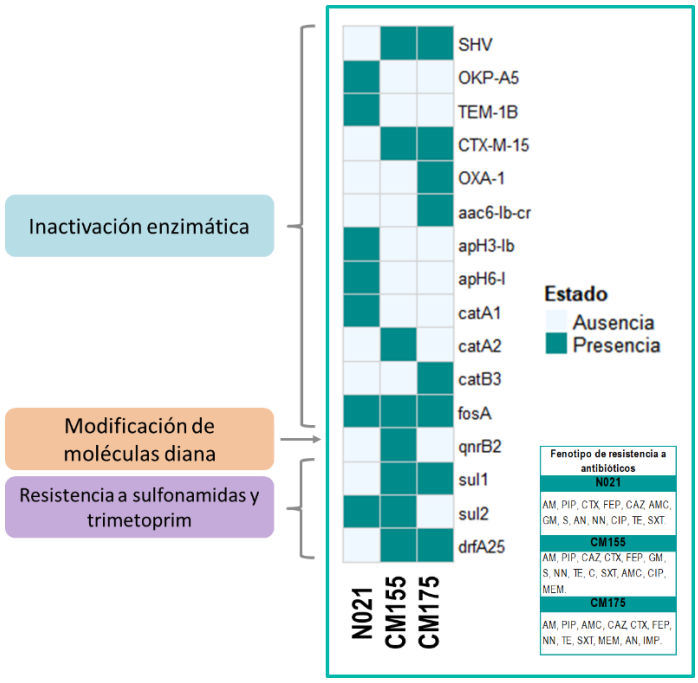


Figura 11.- Genotipo de resistencia a antibióticos de las cepas N021, CM155 y CM175. Se encontraron genes asociados en la inactivación enzimática, modificación de moléculas diana y de resistencia a sulfonamidas y trimetoprim, la búsqueda de los genes se realizó con las bases de datos de ResFinder 4.1 y CARD v1.0.0. AM: ampicilina, PIP: piperacilina, ATM: aztreonam, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, GM: gentamicina, S: estreptomicina, AN: amikacina, NN: netilmicina, CIP: ciprofloxacino, TE: tetraciclina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, C: cloranfenicol, MEM: meropenem, IMP: imipenem.

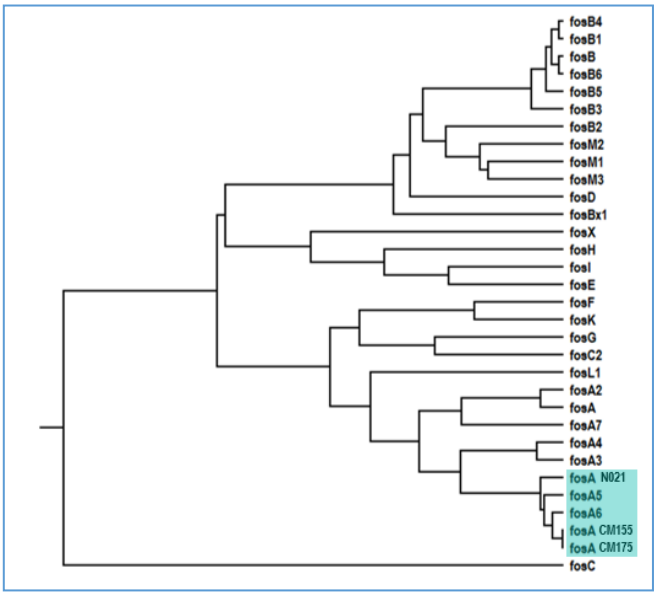


Figura 12.- Dendograma que representa a las variantes de *fos*. Se encontraron variantes de *fosA* distintas a las reportadas actualmente, la variante encontrada en las cepas CM155 y CM175 tuvieron 100% de similitud entre su secuencia de nucleótidos y aminoácidos. Obtenido por el método UPGMA con MEGA7 software. *fosB4* (NG_054661.1), *fosB1* (NG_047886.1), *fosB* (X89875.1), *fosB6* (NG_054662.1), *fosB5* (NG_054663.1), *fosB3* (NG_050412.1), *fosB2* (NG_050411.1), *fosM2* (BK012112.1), *fosM1* (BK012111.1), *fosM3* (BK012113.1), *fosD* (NG_047892.1), *fosBx1* (NG_050591.1), *fosX* (NG_047899.1), *fosH* (NG_047896.1), *fosI* (NG_047897.1), *fosE* (NG_047893.1), *fosF* (NG_047894.1), *fosK* (NG_047898.1), *fosG* (NG_047895.1), *fosC2* (NG_047891.1), *fosL1* (MN464149.1), *fosA2* (NG_050406.1), *fosA* (MG028671.1), *fosA7* (NG_054942.1), *fosA4* (NG_050408.1), *fosA3* (NG_050407.1), *fosA5* (NG_050409.1), *fosA6* (NG_051497.1), *fosC* (NG_047890.1).

Otros mecanismos de resistencia encontrados fueron los genes que codifican para bombas de expulsión y porinas. En la figura 13, se muestra que los genes encontrados fueron: *acrAB, oqxAB* y *tet*. Así como, mutaciones en *ompk36* y *ompk37* que codifican para porinas. Se ha reportado que cuando acrAB y oqxAB están juntas, fácilmente pueden conferir un fenotipo MDR, principalmente a fluoroquinolonas, cloranfenicol y en ocasiones a aminoglucósidos. En la figura 14 se puede observar los grupos de genes que codifican para ambas bombas de expulsión. Donde *acrR* es un represor transcripcional, mientras que *acrA* y *acrB* codifican una lipoproteína periplásmica anclada a la membrana interna y una proteína de membrana integral ubicada en la membrana citoplasmática. También se muestra a los genes *oqxA/oqxB* flanqueados río arriba y río abajo por *rarA y oqxR,* que codifican para un activador transcripcional y para un represor respectivamente, como cepa de referencia se utilizó a la cepa de *K. pneumoniae* KCTC 2242 (CP002910.1). Las mutaciones en el

regulador *acrR* y las encontradas en ambas porinas se describen en la tabla 14. De acuerdo con la predicción realizada con ResFinder 4.1, aquellas mutaciones marcadas en rojo pueden dar como resultado resistencia a antibióticos carbapenémicos.

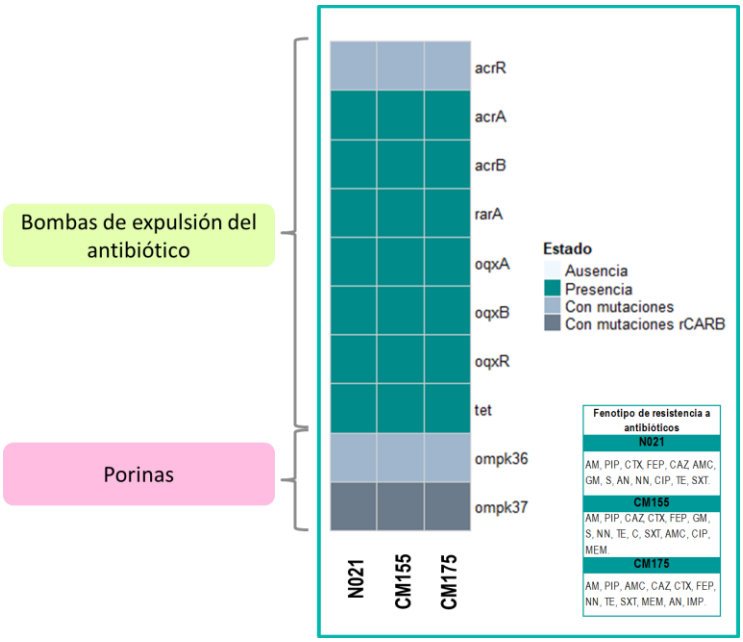


Figura 13.- Genes y mutaciones asociados a resistencia a antibióticos. Se encontraron genes que codifican para bombas de expulsión del antibiótico y porinas asociados a resistencia a antibióticos, la búsqueda de los genes y mutaciones se realizó con ResFinder 4.1. AM: ampicilina, PIP: piperacilina, ATM: aztreonam, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, GM: gentamicina, S: estreptomicina, AN: amikacina, NN: netilmicina, CIP: ciprofloxacino, TE: tetraciclina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, C: cloranfenicol, MEM: meropenem, IMP: imipenem.

Tabla 14.- Mutaciones presentes en el regulador AcrR y en las porinas Ompk36 y Ompk37.

Cepa	Gen	Mutación
N021	*acrR*	P161R; F172S; R173G; L195V; F197I; K201M
	ompk36	N49S; L59V; L191Q; A217S; N218H; Q227N; L229V; N304E
	ompK37	I70M; I128M
CM155	*acrR*	P161R; G164A; F172S; R173G; L195V; F197I; K201M
	ompk36	N49S; L59V; T184P
	ompK37	I70M; I128M
CM175	*acrR*	P161R; G164A; F172S; R173G; L195V; F197I; K201M
	ompk36	N49S; L59V; G189T; F198Y; F207Y; A217S; T222L; D223G; E232R; N304E
	ompK37	I70M; I128M

*Mutaciones relacionadas con resistencia a antibióticos carbapenémicos.

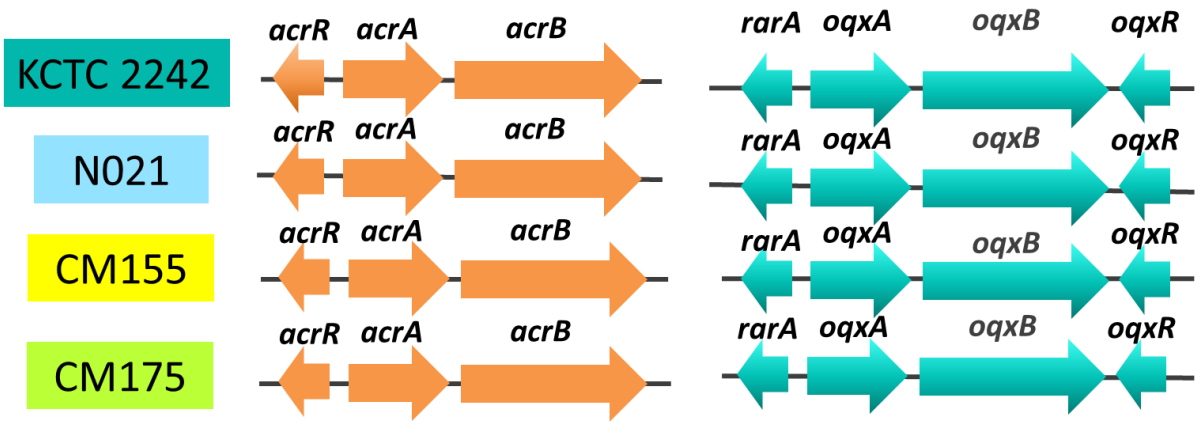


Figura 14.- Representación de los genes de *acrAB* y *oqxAB* presentes en la cepa KCTC 2242 y las 3 cepas de estudio que codifican para bombas de expulsión del antibiótico. En las 3 cepas se encontraron los genes que codifican para las bombas de expulsión AcrAB y OqxAB, así como sus respectivos reguladores, *acrR* es un represor transcripcional mientras que *rarA* y *oqxR* codifican para un activador y un represor transcripcional respectivamente.

9.2.6.2 Elementos Genéticos Movilizables (EGM)

La búsqueda de EGM mostró que las tres cepas de estudio presentaron replicones de tipo *IncFIBk* e *IncR*, además en las cepas CM155 y CM175 también se encontró a *IncN* y *Col440II*. Se identificaron diversas secuencias de inserción, algunos de ellos asociados con genes de resistencia como: *sul1, sul2,* $bla_{\text{CTX-M-15}}$ y un gen de resistencia a telurito *(terC).* Los transposones encontrados fueron *IS*903, *ISVsa3, Tn*5403 e *IS*102 y en las 3 cepas estuvo presente *Int1* (tabla 15).

Tabla 15.- Elementos Genéticos Móviles identificados en las cepas de estudio.

Cepa	Inc	IS	Tn	Integrones
N021	*IncFIB $_k$, IncR*	*ISVsa3 (sul2), ISKpn2, ISEc15, IS903, ISKox1, ISEc33, IS102, ISkpn24, ISkpn21, IS5075, IS26*	*IS903*	*Int1*
CM155	*IncFIB $_k$, IncN, IncR, Col440II*	*IS6100 (sul1), ISEC9 (bla $_{CTX-M-15}$), ISVsa3 (sul2), ISEC52, ISkpn1, IS5075, ISkpn26*	*ISVsa3, Tn5403*	*Int1*
CM175	*IncFIB $_k$, IncN, IncR, Col440I*	*ISEc9 (bla $_{CTX-M-15}$), ISkox1 (terC), ISEch12, IS102, ISEc33, IS903, IS6100, ISkpn26, ISEsa2, IS5075, ISkpn34*	*IS102, IS903*	*Int1*

*Se encontraron diversas secuencias de inserción asociados con *sul1*, *sul2*, $bla_{\text{CTX-M-15}}$ y un gen de resistencia a telurito.

9.2.7 Genotipo de virulencia

9.2.7.1 Genes asociados a la síntesis de la cápsula

Como parte del estudio de la virulencia, se investigó si las cepas contenían los genes *rmpA/rmpA2* relacionados con la hipermucoviscosidad por medio de la herramienta Pathogenwatch. Se obtuvo que, en ninguna de las 3 cepas se encontraron los genes *rmpA* y *rmpA2* que codifican factores de transcripción que regulan positivamente el locus de biosíntesis de la capsula a través de *rcsB.* Por esta razón se buscaron otros genes reguladores reportados en el estudio realizado por Dorman y colaboradores en el 2018, para ver si estaban presentes y ver el porcentaje de similitud en su secuencia con respecto a la cepa NTUH-K2044, la búsqueda se realizó de manera manual en la anotación obtenida con RAST 2.0. En la figura 15, se muestran los genes que estuvieron presentes y los cambios en la secuencia de aminoácidos en comparación con la cepa hipervirulenta.

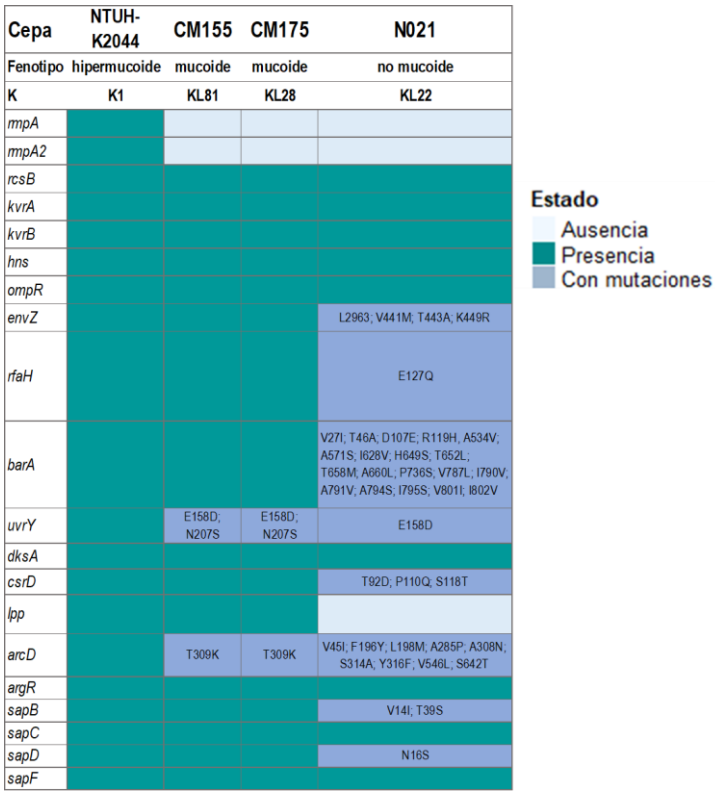


Figura 15.- Genes que codifican para reguladores de la síntesis capsular. Se realizó una búsqueda en la anotación obtenida con RAST 2.0 de los genes reguladores de la producción de cápsula en las cepas de estudio propuestos por Dorman en el 2018, y se realizó una comparación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos con la cepa hvKp NTUH-K2044 con Clustal Omega.

9.2.7.2 Adhesinas fimbriales

Para investigar si estaban presentes los genes de adhesinas fimbriales, se hizo una búsqueda manual en la anotación obtenida de RAST 2.0, lo que se obtuvo fue que estuvieron presentes los genes de las fimbrias tipo I, la fimbria tipo III, el pili ecpRAB y el pili tipo IV. Se realizó una comparación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los genes de las fimbrias con respecto a la cepa hipervirulenta hvKp NTUH-K2044. En la figura 16 se observa que las cepas CM155 y CM175 tienen la misma similitud de secuencia en los genes encontrados entre sí, pero presenta cambios en comparación con algunos genes de la cepa NTUH-K2044. Mientras que la cepa N021, es la cepa que presenta una diferencia mayor en comparación con la cepa de referencia.

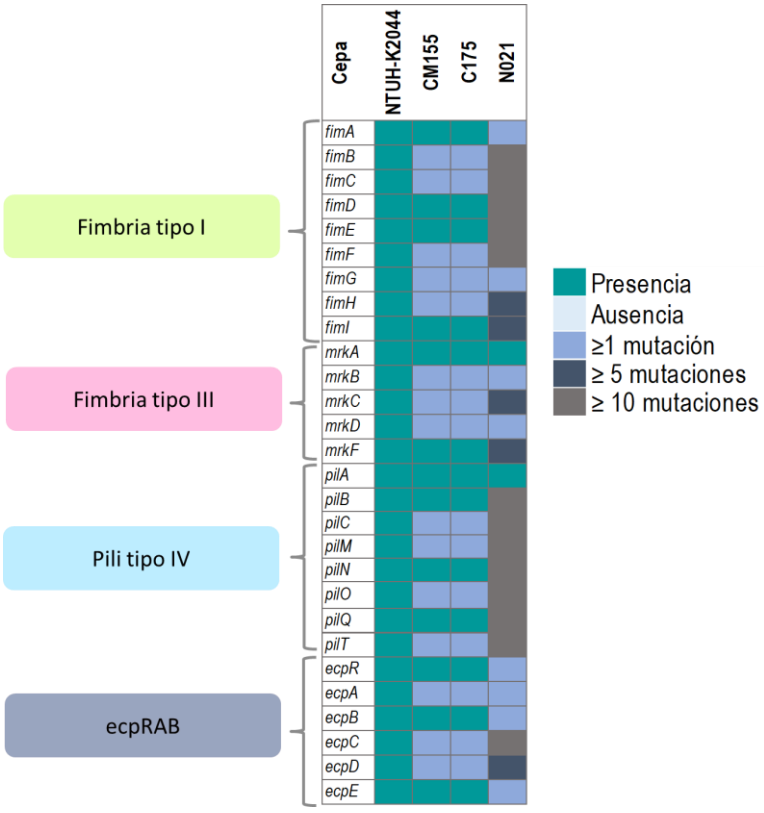


Figura 16.- Genes de virulencia que codifican adhesinas fimbriales encontrados en las cepas de *Klebsiella* spp. Se realizó una búsqueda manual de los genes de adhesinas fimbriales en la anotación obtenida con RAST 2.0 y se hizo una comparación con los genes y aminoácidos encontrados en la cepa NTUH-K2044 mediante alineamientos en Clustal Omega. En la figura se muestran los cambios encontrados en las secuencias de aminoácidos de las cepas con respecto a los genes de la cepa hvKp NTUH-K2044.

9.2.7.3 Sideróforos

Se han caracterizado cuatro sistemas de sideróforos en *Klebsiella* spp. Por lo que en el presente estudio se hizo una búsqueda manual de los genes de sideróforos en la anotación obtenida con RAST 2.0. Aquí se encontraron los genes para la síntesis de enterobactina debido a que es casi ubicua entre las cepas de *K. pneumoniae* clásicas e hvKp. En las 3 cepas se encontraron los genes que codifican el receptor de aerobactina; sin embargo, no se encontraron los genes necesarios para su síntesis. Los genes de sideróforos de salmochelina y yersiniabactina no se encontraron. También se realizaron los alineamientos múltiples de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cada gen y su similitud con la cepa NTUH-K2044 mediante Clustal Omega, los resultados se muestran en la figura 17.

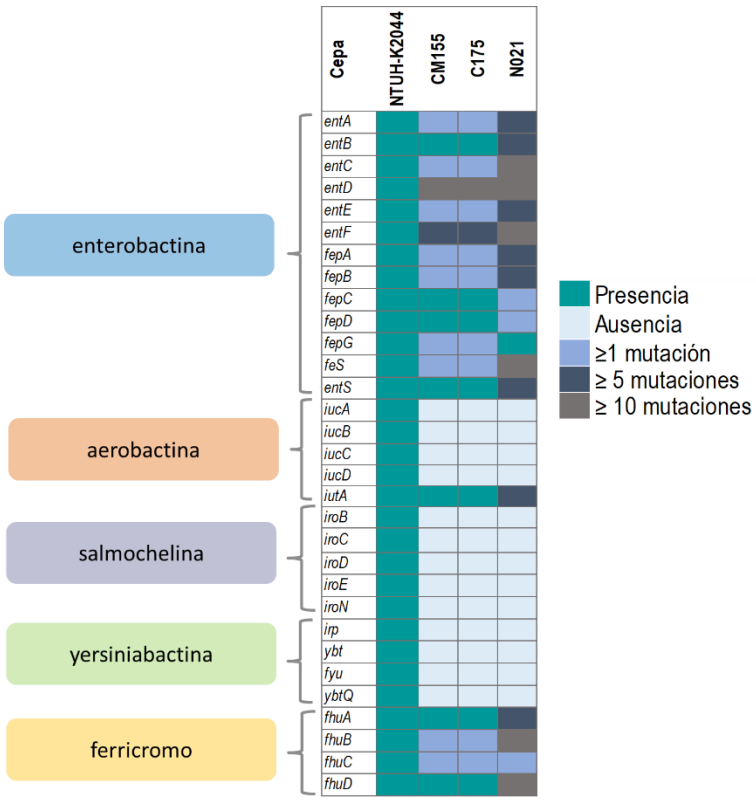


Figura 17.- Genes de virulencia que codifican sideróforos encontrados en las cepas de *Klebsiella* spp. Se realizó una búsqueda manual de los genes de adhesinas fimbriales en la anotación obtenida con RAST 2.0 y se hizo una comparación con los genes y aminoácidos encontrados en la cepa NTUH-K2044 mediante alineamientos en Clustal Omega. En la figura se muestran los cambios encontrados en las secuencias de aminoácidos de las cepas con respecto a los genes de la cepa hvKp NTUH-K2044.

9.2.7.4 Otros factores de virulencia

De forma adicional, se buscaron otros genes de virulencia de *Klebsiella* spp. Por ejemplo, se sabe que *Klebsiella* puede codificar el T6SS con al menos 13 genes centrales distribuidos en diferentes segmentos del genoma. Se ha visto que pueden contribuir a la virulencia y en la eliminación eficaz de competidores. Aquí se encontró en dos cepas (CM155 y CM175) al gen que codifica para *pyocina S* ubicada dentro de este locus. También se encontró el gen de la hemolisina *hlyIII*. El locus *pga*, que puede estar asociado con la formación de biofilm, *MivM*, involucrado en el metabolismo del ácido siálico y *KfuBC* en la cepa N021, este último asociado con la hipervirulencia (figura 18).

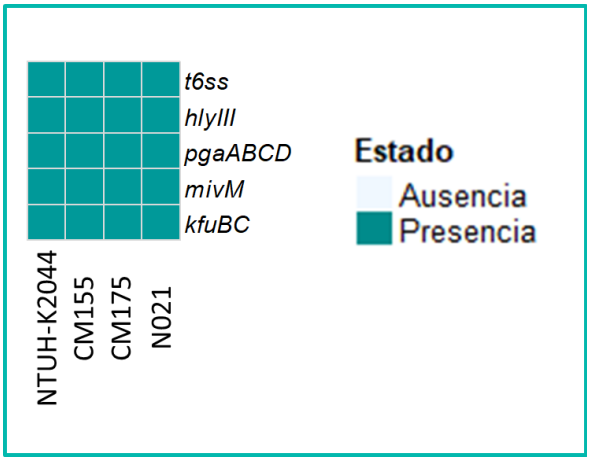


Figura 18.- Otros genes asociados con la virulencia presentes en las cepas de estudio. Se buscaron genes adicionales relacionados con la virulencia en la anotación obtenida con RAST 2.0, entre ellos se encontraron los locus del sistema de secreción tipo VI, el gen *hlyIII*, el locus *pgaABCD*, *mivM* y *kfuBC*. Estos genes se compararon con los genes de virulencia encontrados en la cepa NTUH-K2044 mediante Clustal Omega.

9.2.8 Resultados del análisis de la organización genética de las adhesinas fimbriales

9.2.8.1 Fimbria tipo I

Con el objetivo de conocer la diversidad alélica y la organización de las adhesinas fimbriales encontrados en las cepas de estudio, se realizaron múltiples alineamientos con la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las subunidades de la fimbria tipo I

de las cepas de estudio y los genes de las cepas MGH78578, NTUH-K2044, C3091, KqPF26 y KPC142 de *Klebsiella* spp. reportadas en la base de datos del Genbank. La búsqueda de los genes se realizó de manera manual en la anotación obtenida con RAST 2.0, tomando como referencia los genes de la cepa NTUH-K2044 reportados en la base de datos de VFDB. La organización genética del grupo de genes que codifican para la fimbria tipo I obtenida de la búsqueda en la anotación con RAST 2.0 de cada una de las cepas se muestra en la figura 19.

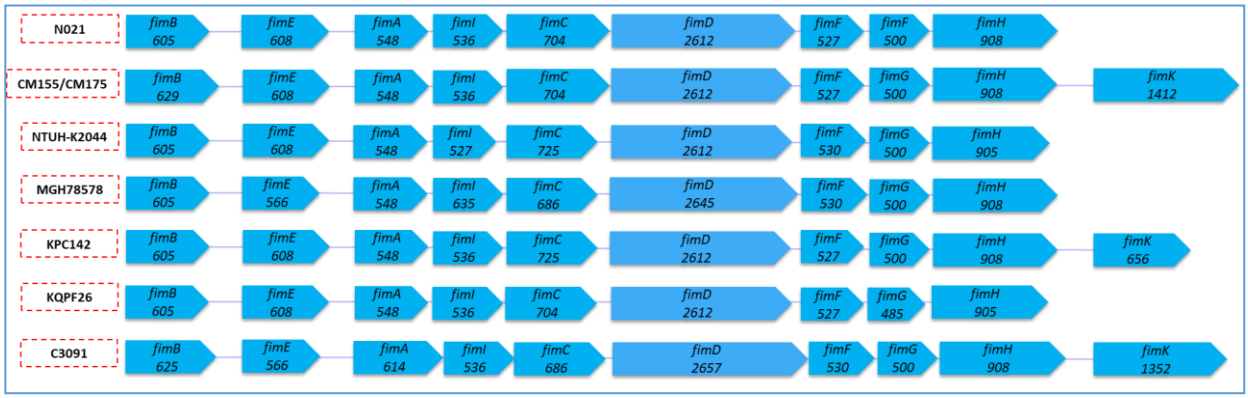


Figura 19.- Organización genética de la región *fim* presente en las cepas analizadas. El tamaño de cada uno de los genes se muestra en nucleótidos. En el análisis se incluyeron cepas de *K. pneumoniae* (NTUH-K2044, MGH 78578, C3091) y *K. quasipneumoniae* (KPC142, KQPF26), las secuencias de nucleótidos se obtuvieron de la anotación con RAST 2.0.

Todas las cepas contenían los genes *fimB, fimE, fimA, fimI, fimC, fimD, fimF, fimG y fimH*; sin embargo, diferían en cuanto a su tamaño en nucleótidos. Únicamente en las cepas CM155, CM175, KPC142 y C3091 estuvo presente el gen *fimK,* que se cree que tiene participación en la regulación de la expresión de la fimbria tipo I (Pusz *et al*., 2014). En la tabla 16 se muestran los porcentajes de identidad en aminoácidos de las 3 cepas de estudio con respecto a las cepas con las que se realizó el análisis, las cepas CM155 y CM175 no tuvieron cambios en su secuencia entre ellas con excepción de FimB. Como se puede observar existe una gran variabilidad entre las cepas N021, CM155 y CM175, con respecto a las cepas seleccionadas de *K. pneumoniae* y *K. quasipneumoniae.* La cepa N021 tuvo un 100% de identidad con FimA de KqPF26 y KPC142. Mientras que las cepas CM155 y CM175, tuvieron 100% de identidad con FimA, de MGH 78578, NTUH-K2044 y C3091; FimB de MGH 78578

y C3091; FimD de MGH 78578 y NTUH-K2044; FimE de NTUH-K2044; FimF de C3091; FimG de MGH 78578 y C3091; FimH de NTUH-K2044, C3091 y KPC142; FimI de NTUH-K2044 y C3091. Por otra parte, el porcentaje más bajo fue para FimK con 95.7% y 62.3% de las cepas C3091 y KPC142.

Tabla 16.- Porcentajes de identidad de aminoácidos de la fimbria tipo I de las cepas de *Klebsiella* spp.

	Fimbria tipo I																			
Cepa	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175
	FimA (182 aa)		FimB (201 aa)		FimC (234 aa)		FimD (870 aa)		FimE (202 aa)		FimF (175 aa)		FimG (166 aa)		FimH (302 aa)		FimI (178 aa)		FimK (470 aa)	
[1]MGH 78578	98.9	100	96	100	91.9	97	89.4	100	84.2	93.1	97.2	98.9	99.4	100	99.0	99.7	94.9	97.8	-	-
[1]NTUH-K2044	98.4	100	94	99.5	91.7	96.7	90	100	95	100	93.2	97.2	97.6	99.4	98.7	100	97.8	100	-	-
[1]C3091	98.9	100	96.5	100/ 70.1	92.3	97.4	84.8	94.9	85.1	93.1	94.3	100	98.8	100	99.3	100	96.6	100	-	95.7
[2]KqPF26	100	98.4	99.5	95.5/65.2	98.3	95.3	91.8	97.1	98.5	91.6	96	93.1	95.8	95.2	98.3	99	98.9	95.5	-	-
[2]KPC142	100	98.9	99.5	94.5/ 66.7	95	91.3	92.1	97	98.5	91.5	96.6	93.7	98.8	98.2	99.7	100	98.9	95.5	-	62.3

[1]*K. pneumoniae*, [2]*K. quasipneumoniae*

9.2.8.2 Fimbria tipo III

Al igual que para la fimbria tipo I, para investigar la diversidad alélica y la organización de la fimbria tipo III encontrados en las cepas de estudio, se realizaron múltiples alineamientos con la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las subunidades que codifican para la fimbria tipo III de las cepas de estudio y los genes de las cepas MGH78578, NTUH-K2044, C3091, KqPF26 y KPC142 de *Klebsiella* spp. La búsqueda de los genes se realizó de manera manual en la anotación obtenida con RAST, tomando como referencia los genes de la cepa NTUH-K2044 reportados en la base de datos de VFDB. La organización genética del grupo de genes que codifican para la fimbria tipo I obtenida de la búsqueda en la anotación con RAST de cada una de las cepas se muestra en la figura 20.

Los genes *mrkA, mrkB, mrkC, mrkD, mrkF y mrkJ* estuvieron presentes en todas las cepas, mientras que *mrkI* se encontró en las cepas N021, CM155, CM175, NTUH-K2044, MGH78578, KPC142 y KqPF26, y *mrkH* solo en las cepas N021, CM155, CM175, NTUH-K2044, KPC142 y KqPF26. En la tabla 17 se muestran los porcentajes de identidad en aminoácidos de las 3 cepas de estudio con respecto a las cepas con las que se realizó el análisis, las cepas CM155 y CM175 no tuvieron cambios en su secuencia entre ellas. La cepa N021 tuvo un 100% de identidad con MrkA de las cepas NTUH-K2044, C3091, KqPF26 y KPC142; y MrkB de MGH78578.

Las cepas CM155 y CM175 tuvieron 100% de identidad con MrkA de NTUH-K2044, C3091, KqPF26 y KPC142; MrkB de MGH 78578 y KPC142; MrkD de MGH 78578 y NTUH-K2044; MrkF de MGH 78578 y NTUH-K2044; MrkI de NTUH-K2044, MrkI de NTUH-K2044; y MrkJ de NTUH-K2044.

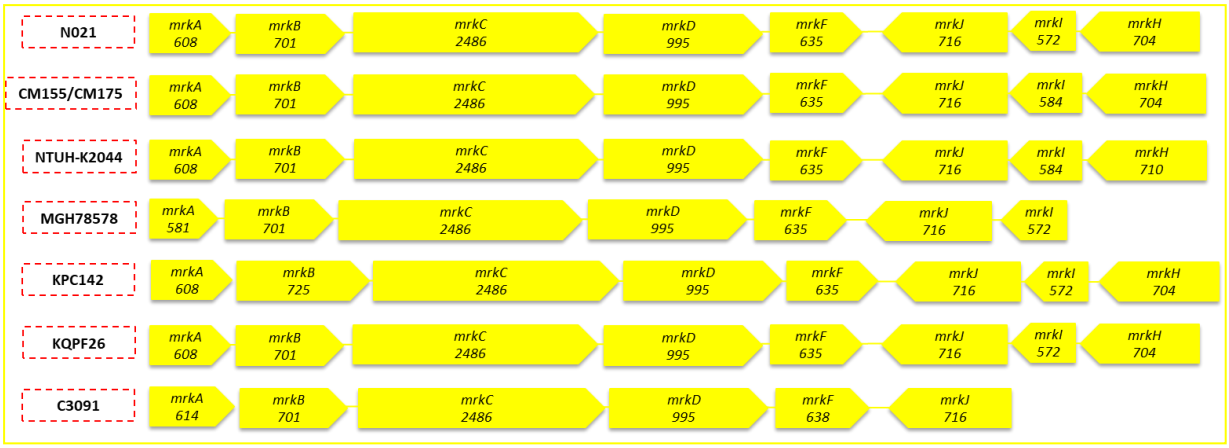


Figura 20.- Organización genética de la región *mrk* presente en las cepas analizadas. El tamaño de cada uno de los genes se muestra en nucleótidos. En el análisis se incluyeron cepas de *K. pneumoniae* (NTUH-K2044, MGH 78578, C3091) y *K. quasipneumoniae* (KPC142, KQPF26), las secuencias de nucleótidos se obtuvieron de la anotación con RAST 2.0.

Tabla 17.- Porcentajes de identidad de aminoácidos de la fimbria tipo III de las cepas de *Klebsiella* spp.

	Fimbria tipo III															
Cepa	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175
	MrkA (202 aa)		MrkB (233 aa)		MrkC (828 aa)		MrkD (331 aa)		MrkF (211 aa)		MrkH (234 aa)		MrkI (194 aa)		MrkJ (238 aa)	
[1]MGH 78578	95.5	95.5	100	100	99.4	99.9	98.5	100	98.1	100	-	-	92.8	97.4	95.8	99.1
[1]NTUH-K2044	100	100	99.1	99.6	99	99.9	99.4	100	97.6	100	98.7	100	88.7	100	95.8	100
[1]C3091	100	100	99.1	99.6	99.2	99.9	98.8	99.9	97.2	99.5	-	-	-	-	91.3	96.8
[2]KqPF26	100	100	99.1	98.7	99.6	99.4	99.7	99.4	98.1	97.2	99.6	98.3	95.9	87.3	98.7	94.5
[2]KPC142	100	100	99.1	100	99.8	99.4	99	98.8	98.6	97.6	98.3	97.4	97.4	87.6	98.3	94.1

[1]*K. pneumoniae*, [2]*K. quasipneumoniae*

9.2.8.3 Pili tipo IV

También se realizaron múltiples alineamientos de nucleótidos y aminoácidos de los pili tipo IV de las cepas N021, CM155 y CM175 con respecto a los genes de las cepas de *K. pneumoniae* (MGH 78578 y NTUH-K2044) y *K. quasipneumoniae* (KqPF26, A708 y ATCC 700603) reportadas en la base de datos del Genbank, con la finalidad de conocer la diversidad alélica que existe entre estas cepas. Esto se

llevó a cabo mediante una búsqueda manual de los genes que codifican los pili tipo IV en la anotación con RAST 2.0 del ensamble con SPAdes 3.9. De acuerdo con la anotación, los genes del pili tipo IV encontrados fueron *pilA, pilB, pilC, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ* y *pilT.* En la cepa NTUH-K2044 no se encontró pilP y tampoco en las cepas CM155 y CM175. En la tabla 18 se muestran los porcentajes de identidad en aminoácidos de las 3 cepas de estudio con respecto a las cepas de *K. pneumoniae* y *K. quasipneumoniae*, las cepas CM155 y CM175 no tuvieron cambios en su secuencia entre ellas. Se buscó la localización y los motivos conservados de la secuencia de aminoácidos de cada subunidad de las cepas N021, CM155 y CM175 mediante Pfam y NCBI Conserved Domain, los resultados se muestran en el ANEXO 14.4.

Tabla 18.- Porcentajes de identidad de aminoácidos del pili tipo IV de las cepas de *Klebsiella* spp.

	Pili tipo IV																	
Cepa	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175	N021	CM155/ CM175
	pilA (143 aa)		pilB (461 aa)		pilC (401 aa)		pilM (266 aa)		pilN (177 aa)		pilO (142 aa)		pilP (126 aa)		pilQ (414 aa)		pilT (236 aa)	
[1]MGH 78578	98.6	100	97.4	100	92.3	99.3	94.4	99.6	84.7	100	78.9	98.6	85.7	-	97.3	100	94.1	98.3
[1]NTUH-K2044	98.6	100	97.6	100	92.5	99.5	94.0	99.6	84.7	100	78.2	99.3	-	-	97.3	98.8	94.1	98.3
[2]KqPF26	100	98.6	98.9	97.6	98.0	91.8	97.0	91.7	92.1	85.3	91.5	76.8	88.1	-	98.8	95.9	97.0	94.5
[2]A708	99.3	97.9	99.8	97.2	99.0	91.5	99.2	93.6	98.3	84.7	94.4	76.1	99.2	-	99.8	96.9	100	94.1
[2]ATCC 700603	100	98.6	98.7	97.4	97.8	91.8	97.4	92.1	91.5	85.9	92.3	77.5	88.1	-	98.8	96.1	97.5	94.9

[1]*K. pneumoniae*, [2]*K. quasipneumoniae*

10 DISCUSIÓN

A lo largo del tiempo *Klebsiella* spp. ha logrado la acumulación de diferentes genes que le confieren resistencia a las cuatro clases más importantes de antibióticos, es decir, cefalosporinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y carbapenémicos, lo que ha dado como resultado cepas XDR que a menudo se convierten en un desafío al momento de brindar un tratamiento adecuado al paciente. Debido a la importancia que tienen estos antibióticos en la actualidad, en el estudio realizado por Pérez-Sánchez se realizaron pruebas de susceptibilidad a las cepas de *Klebsiella* provenientes de diferentes hospitales y un laboratorio clínico, en el que se demostró que las cepas de este estudio fueron principalmente resistentes a β-lactámicos, seguido de aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfamidas, fluoroquinolonas y fenicoles.

Debido a la importancia que tienen los antibióticos carbapenémicos en el tratamiento de las infecciones, se tuvo un mayor interés en el estudio de las 9 cepas resistentes a estos antibióticos. Se investigó si estas cepas contenían plásmidos, ya que como antecedente se conocía que 8 de las 9 cepas portaron *bla*$_{VIM}$ y 2 de las cepas correspondieron a la variante *bla*$_{VIM-23,}$ que a su vez estaba asociado a un integrón de clase 1, estos aislamientos correspondieron a especies distintas y hospitales diferentes.

La metalo-β-lactamasa VIM se ha descrito principalmente en Europa y Asia, en aislamientos de *Klebsiella* spp. de hospitales de Grecia, donde se han encontrado plásmidos que codifican *bla*$_{VIM-1}$ de un tamaño de entre 50 a 60 kb del grupo de incompatibilidad IncN, estos plásmidos han prevalecido en este país desde inicios del 2001. Otro de los plásmidos descritos es pNL194 en Atenas en 2007 de 79.3 kb, que corresponde a IncN y además de incluir a *bla*$_{VIM-1}$ también estaban presentes *aacA7, aadA1, aadA2, dfrA1, dfrA12, aphA1, strA, strB* y *sul1* (Loli *et al*., 2006; Miriagou *et al*., 2010). En México se ha informado de la diseminación de un plásmido de 450 kb que alberga *bla*$_{VIM-2}$ entre especies de *Enterobacter cloacae* y *K. oxytoca* (Morfin-Otero *et al*., 2009). Así mismo, en Guadalajara, México, se identifica *bla*$_{VIM}$ de *E. cloacae* en una muestra de sangre de un paciente de 18 años con quemaduras, esta cepa fue resistente a β-lactámicos incluidos carbapenémicos, y se mantuvo

susceptible a aztreonam, gentamicina, tetraciclina, tigeciclina, fluoroquinolonas y polimixina B. La secuenciación muestra una metalo-β-lactamasa distinta a *bla*$_{VIM-2}$, esta difiere por una mutación puntual de una Arginina por una Serina en el aminoácido 228, a la que se denominó *bla*$_{VIM-23}$ y al igual que los aislamientos de *K. oxytoca* y *E. cloacae* del 2005 estaban asociado a un integrón de clase 1. Además, se observa que las cepas productoras de VIM tienen varias bandas de plásmido, sin embargo, el gen *bla*$_{VIM}$ se encontró en una banda plasmídica de 450 kb (Castanheira *et al* 2011). En el presente trabajo encontramos que los aislamientos portadores de *bla*$_{VIM}$ fueron resistentes a múltiples β-lactámicos que incluyeron a meropenem e imipenem y a diferencia de las cepas de *E. cloacae,* estas cepas si presentaron resistencia a otras familias de antibióticos como fluoroquinolonas y aminoglucósidos, y algunas portaron además los genes *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{TEM}$ y *bla*$_{CTX-M}$. Así mismo, las cepas portaron bandas plasmídicas de distintos tamaños, 2 de un tamaño similar en estas cepas (48 kb y 154 kb aproximadamente). Sin embargo, falta corroborar en dónde se está ubicado el gen *bla*$_{VIM}$ y si se encuentra junto con otros genes de resistencia en un mismo plásmido. A pesar de que *bla*$_{VIM}$ se asocia a plásmidos de tipo IncN, aquí los más prevalentes fueron IncFIC, IncFIA, IncY y CoelETp no antes relacionados con *bla*$_{VIM.}$

Las 9 cepas hipermucoides de *K. pneumoniae* también presentaron bandas plasmídicas que podrían albergar genes de resistencia, pero también de virulencia. Este experimento se realizó debido a que las cepas hvKp se relacionan comúnmente con la hiperviscosidad mediada por *rmpA* codificada en plásmidos junto con otros genes de virulencia como aerobactina y salmochelina. A pesar de que estas cepas fueron negativas para *rmpA* otros genes podrían estar presentes, por ejemplo, el plásmido pKpST66-2 que contiene a la variante *rmpA2* en una cepa de *K. pneumoniae* de los replicones IncFII/IncFIA o el plásmido pKp104014_1 reportado en el 2014 en una cepa de *K. pneumoniae*, que además de codificar a *rmpA2* también contiene a *iucABCDiutA* y en el cual se encuentra otro plásmido con los genes de resistencia *bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{TEM-1}$, *bla*$_{SHV-5}$ (Ye *et al*., 2016; Lam *et al*., 2019). Por esta razón, es importante realizar la caracterización de estos plásmidos, así como buscar genes de virulencia que se encuentren reportados en cepas hvKp.

Después de que se declaró la pandemia del SARS-COV-2, no fue posible continuar con la parte experimental de este proyecto, por lo que, para continuar con el trabajo, se realizó el análisis de la secuenciación completa de 3 genomas de cepas de *Klebsiella* spp. aisladas del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y del Hospital Para el Niño Poblano.

La secuenciación del genoma completo se ha convertido en una herramienta importante para que los profesionales de la salud tengan a su disposición información epidemiológica relevante de diferentes patógenos. En específico, para el análisis del genoma de *Klebsiella* spp*,* existen diversas herramientas para la tipificación, así como la detección de genes relacionados con la resistencia a antibióticos; sin embargo, debido a la necesidad de tener un mejor conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad, también se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten realizar la búsqueda de genes relacionados con la virulencia (Wick *et al.*, 2018). Aquí se utilizaron diferentes programas bioinformáticos para el análisis de los resultados de secuenciación de las cepas de *Klebsiella,* así como una búsqueda manual para aquellos genes que no están disponibles en las bases de datos.

Muchos de los aislamientos de *Klebsiella* spp. son identificados erróneamente en laboratorios clínicos y de investigación como *K. pneumoniae,* en parte debido a que *K. pneumoniae* es la especie más prevalente entre los aislados clínicos. Por otra parte, los ensayos que suelen utilizarse para su identificación son pruebas bioquímicas y moleculares, que en ocasiones tienen dificultades para diferenciar especies estrechamente relacionadas con *K. pneumoniae* e incluso otras especies con las que comparten una identidad de nucleótidos promedio del 90% también pueden identificarse de forma errónea como *K. pneumoniae.* Una de las herramientas que ha sido útil para su diferenciación es la WGS, pero debido a su costo y metodología son pocos los laboratorios que utilizan esta herramienta (Long *et al*., 2017; Rodrigues *et al*., 2018). Dos de las tres cepas de este estudio fueron identificadas correctamente como *K. pneumoniae*, pero de acuerdo con la WGS de la cepa N021, esta correspondió a *K. quasipneumoniae* del grupo filogenético KpII.

Anteriormente se consideraba que especies distintas a *K. pneumoniae* eran menos virulentas en humanos; sin embargo, es común su aislamiento de diferentes sitios de infección (Berry *et al*., 2015; Long *et al*., 2017). Por lo que la incorrecta identificación de *Klebsiella* en la práctica clínica posiblemente haya subestimado la patogenicidad y la prevalencia real de otras especies relevantes de *Klebsiella* spp. En México se ha aislado a *K. quasipneumoniae* (Garza-Ramos *et al*., 2016); sin embargo, esta es la primera vez que se reporta a *K. quasipneumoniae* proveniente de un hospital pediátrico de la Ciudad de Puebla.

Existe una gran variedad de clones de *Klebsiella* spp causantes de infecciones. Sin embargo, solo un conjunto de estos contribuye a la morbilidad global. De manera general se distinguen dos tipos de clones, aquellos resistentes a múltiples fármacos y los clones hipervirulentos. Los primeros son resistentes a cefalosporinas y/o carbapenémicos y están ampliamente distribuidos en el mundo. De los cuales podemos mencionar a los grupos clonales: CG258, CG15, CG20, CG17, CG29, CG37, CG147, CG101, CG43 y CG307. En comparación con los clones resistentes a múltiples fármacos, los clones hipervirulentos tienen una menor distribución global. Entre los grupos clonales más importantes podemos mencionar a CG23, CG65, CG86, CG25, CG66 y CG380 (Wyres *et al*., 2020). Las cepas cKp y hvKp han demostrado estar relacionados con un determinado ST, locus K y locus O, como es el caso del ST258. En un trabajo donde se exploró la diversidad del locus K y locus O dentro de este grupo clonal, muestra que los tipos dominantes son KL107 y O2v2 en un 65%. Así como CG28, otros clones problemáticos MDR también pueden albergar diversos locus K y locus O, lo que permite que puedan ser utilizados como marcadores epidemiológicos para ayudar a la tipificación de cepas MDR (Satlin *et al*., 2017; Deleo *et al*., 2014). De los tres ST que se determinaron en este estudio, ninguno tuvo relación con los clones hipervirulentos reportados actualmente, pero uno de ellos, el ST20 de la cepa CM175 formó parte del complejo clonal CG20 de los linajes MDR, del locus KL28 y O1v2, lo cual coincide con lo reportado anteriormente para este linaje MDR. Además de KL28 y O1v2, el ST20 también está relacionado con los locus KL101 y KL109, O1v1 y O2v2 (Walker *et al*., 2019). La diversidad del antígeno K es muy amplia; aunque se ha reportado que los antígenos capsulares

asociados con enfermedad en cepas hvKp son principalmente K1 y K2, seguidos de K5, K20, K47, K54, K57 y K64 (Follador *et al*., 2016), los cuales no se encontraron en este estudio. Por otra parte, los antígenos O relacionados con enfermedad son O1, O2 y O3 (Fang *et al*., 2016). En otro estudio donde se analizaron un total de 573 aislamientos, la mayoría fue genotipado como O1 (52%), seguido de O2 (16%), O3 (15%), O5 (6%), OL101 (5%), O4 (3%) y O12 (2%). Aquí, dos de los aislamientos correspondieron a dos de los antígenos O más prevalentes asociados a enfermedad, es decir O1 y O5, pero uno de ellos correspondió al tipo OL101, recientemente descrito, que tiene un origen en Europa, Asia y América del Norte y el cual se asoció con portadores asintomáticos (Follador *et al*., 2016).

Actualmente el peligro de la resistencia a antibióticos al que se enfrentan los hospitales se ha vuelto un problema importante de salud pública mundial, que ha ido en incremento por la aparición de cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles (Pendleton *et al*., 2013). En especial, *K. pneumoniae* se asoció con diferentes genes de resistencia por vez primera antes de su diseminación a otras especies clínicamente importantes (Wyres & Holt, 2018). Mediante el análisis del genoma completo de cada una de las cepas, se encontraron diferentes genes de resistencia a antibióticos. Como se esperaba en las dos cepas de *K. pneumoniae* se encontró *bla*$_{SHV}$, debido a que es un gen que se encuentra en el cromosoma de *K. pneumoniae* y que le confiere resistencia a ampicilina, mientras que en la cepa de *K. quasipneumoniae* en su lugar se encontró a su ortólogo, es decir al gen *bla*$_{OKP-A5}$ característico de *K. quasipneumoniae,* por lo que este hallazgo también corrobora la especie en esta cepa (Haeggman *et al*., 2004).

Aquí se encontró en dos de las cepas a *bla*$_{CTX-M-15}$, que codifica para una BLEE. Como ya se ha informado el tipo de CTX-M varía geográficamente; sin embargo, *bla*$_{CTX-M-15}$ corresponde al alelo más prevalente con distribución mundial (Wang *et al*., 2013). Es común que las BLEE sean transportadas por medio de plásmidos e hidrolizan eficazmente cefalosporinas y monobactams. En *K. pneumoniae* se han relacionado a plásmidos IncFII e IncFI con *bla*$_{CTX-M-15}$ de los ST 1, 11, 14, 17, 20, 35 y 36 en cepas aisladas de neonatos y adultos (Mshana *et al*., 2009; Oteo *et al*., 2009),

lo que demuestra que es un gen ampliamente extendido a varios clones de *K. pneumoniae.* Aquí se obtuvo que *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ de la cepa CM175 del ST20 se encontró en un plásmido de tipo IncN, mientras que *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ de la cepa CM155 no se le pudo asociar a algún plásmido encontrado y este correspondió al ST867 no relacionado. En el fenotipo de resistencia se observó que las cepas CM155 y CM175 fueron resistentes a antibióticos carbapenémicos, aunque mediante el análisis *in sílico* no se encontraron carbapenemasas que pudieran mediar esta resistencia. Así mismo, se encontraron mutaciones en dos porinas conocidas como ompk36 y ompk37, lo que sugiere que la resistencia puede ser causada por la disminución de la importación de carbapenem a través de la membrana externa (Rocker *et al*., 2020). Anteriormente se han descrito dos porinas principales en *K. pneumoniae*, estas son Ompk35 y Ompk36 que se encuentran en la mayoría de los aislamientos clínicos (Doménech-Sánchez *et al*., 1999). Sin embargo, sólo se encontró *ompk36* y *ompk37* en las cepas. En un estudio donde se caracteriza a la porina Ompk37, los resultados sugirieren un poro más estrecho a diferencia de las porinas principales Ompk35 y Ompk36 y por lo tanto es menos susceptible a los antibióticos β-lactámicos (Doménech-Sánchez *et al*., 1999).

Por otra parte, el interés por la fosfomicina para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos resistentes a múltiples antibióticos ha incrementado, especialmente para el tratamiento de infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli*. No obstante, la resistencia a fosfomicina se describió por primera vez en el año de 1980 en un aislamiento de *Serratia marcescens*, donde el gen *fosA* se encontró asociado al transposón Tn2921 que codifica para una glutatión-S-transferasa (Navas *et al*., 1990). La variante descrita con mayor frecuencia en Gram negativos corresponde a *fosA*. En *E. coli* se ha descrito la variante *fosA3* mediada por plásmidos en países de Asia, así como, *fosA5* en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae;* mientras que en el 2016 se describió a la variante *fosA6* en Estados Unidos (Hou *et al*., 2012; Ma *et al*., 2015; Guo *et al*., 2016). En las 3 cepas de este estudio se encontraron variantes nuevas del gen de resistencia a fosfomicina *fosA*. El gen *fosA* de la cepa N021, tuvo un porcentaje de identidad del 94.96% con respecto a *fosA5* y *fosA6,* mientras que el gen *fosA* de las cepas CM155 y CM175 tuvieron un

98.56% para los mismos genes. En estudios anteriores se ha visto que *K. pneumoniae* actúa como reservorio ubicuo de *fosA* para *E. coli* lo cual es un fenómeno preocupante debido a la presión de selección ejercido por el uso creciente de fosfomicina (Guo *et al*., 2016; Huang *et al*., 2020), razón por la cual es importante dar a conocer los contextos genéticos de las nuevas variantes de *fosA,* así como evaluar sus propiedades catalíticas.

Actualmente, las bombas de eflujo han tenido un papel importante en la resistencia, éstas se encuentran ubicadas en el cromosoma y en plásmidos de una gran variedad de bacterias. Una de ellas es la bomba OqxAB, descrita por primera vez en el plásmido pOLA52 de *E. coli* de estiércol de cerdo donde se utilizó olaquindox como aditivo alimentario*,* estos genes están presentes en el cromosoma de *K. pneumoniae,* por lo que es probable que el plásmido en *E. coli* se adquiriera de *K. pneumoniae* y también se diseminara a otras especies (Hansen *et al.,* 2004). En este estudio, las 3 cepas portaron en el cromosoma los genes *oqxAB,* pero solo en dos cepas se observó resistencia a fluoroquinolonas. Aunque se sabe que los niveles de expresión génica de *oqxAB* tiene una susceptibilidad reducida a quinolonas (CMI: 0.008-0.25 mg/L), es importante tomar en cuenta a estos genes ya que aquellos que son movilizados por plásmidos suelen expresarse a niveles clínicamente relevantes en *K. pneumoniae*, pero también en otras especies como *E. coli*. Además, se ha visto que su sobreexpresión confiere resistencia a quinolonas, tigeciclina, nitrofurantoína, cloranfenicol, detergentes y desinfectantes (Li *et al*., 2019; Wyres *et al*., 2020). Otro sistema de expulsión de antibiótico, que también confiere resistencia a fluoroquinolonas es AcrAB codificado en el operón *acrRAB.* Esta bomba está conformada por el represor *acrR* y los genes *acrA* y *acrB* que codifican una lipoproteína periplásmica anclada a la membrana interna (Ramaswamy *et al*., 2017). En un estudio realizado en 19 cepas de *K. pneumoniae* se observa que mutaciones en el represor AcrR dieron como resultado una mayor resistencia a fluoroquinolonas (Padilla *et al*., 2010), por lo que las mutaciones que se encontraron en este regulador pueden contribuir a la resistencia a fluoroquinolonas. Otros genes de resistencia a fluoroquinolonas encontrados en dos de las cepas fueron los genes *qnrB2 y aac(6')-Ib-cr,* el primero es miembro de la familia de proteínas de pentapéptidos repetidos

que ha demostrado que puede bloquear la acción de ciprofloxacino sobre la ADN girasa y topoisomerasa IV y el segundo codifica para un aminoglucósido acetiltransferasa que causa una N-acetilación de la piperazinilamina del ciprofloxacino. Aunque ambos confieren resistencia de bajo nivel, pueden facilitar la selección de mutaciones en la ADN girasa y topoisomerasa IV y de esta manera tener una mayor resistencia a fluoroquinolonas. Además, se sabe que la *aac(6')-Ib-cr* también puede conferir resistencia a aminoglucósidos (Park *et al*., 2006).

Debido a que las cepas CM155 y CM175 presentaron un fenotipo hipermucoide, primero se buscaron los genes *magA*, *rmpA* y *rmpA2*, involucrados en la sobreproducción de cápsula extracelular, pero estos no se encontraron; sin embargo, es importante corroborar si estas cepas presentan una prueba de “cuerdas” positiva. Actualmente no se conoce con exactitud como es que se logra o regula la síntesis de la cápsula, no obstante, recientemente se realizó un estudio donde se identificaron diversos genes que no se habían relacionado previamente con la síntesis capsular en *K. pneumoniae,* donde se toma como referencia a las cepas NTUH-K2044 y ATCC 43816 (Dorman *et al*., 2018). Tal como se muestra en la figura 17, algunos de estos genes estuvieron presentes en las cepas, pero difirieron en cuanto a su secuencia de nucleótidos y aminoácidos, principalmente la cepa N021, esto en parte se puede deber a que corresponde a una cepa de *K. quasipneumoniae,* ya que existen diferencias incluso entre los genes asociados a la síntesis capsular en cepas de la misma especie, pero con antígenos capsulares distintos K1 y K2 (Dorman *et al*., 2018). A pesar de que la hipermucoviscosidad se relaciona con la hvKp, también se han encontrado cepas cKp hipermucoides MDR y resistentes a carbapenémicos o cepas con diferentes grados de hiperviscosidad.

La capacidad que tiene *Klebsiella* spp. para poder adherirse a diferentes sitios anatómicos, así como superficies es un paso importante para el establecimiento de las infecciones. Como ya se ha informado, las cepas de *Klebsiella* spp. poseen genes *fim* muy cerca del grupo de genes *mrk* ubicados en una región del cromosoma de aproximadamente 20.4 kb (Struve *et al*., 2009). En un estudio de siete aislamientos de diferentes orígenes se realizaron PCR para la búsqueda de este

fragmento obteniendo productos de PCR de tamaño idéntico, mientras que un análisis de los nucleótidos en esta región fue del 99%. Sin embargo, se ha reportado un pequeño conjunto de cepas de *K. pneumoniae* donde el grupo de genes *mrk* también esta codificado en plásmidos, una de las diferencias con respecto a *mrk* del cromosoma es el gen *mrkE* que se encuentra río arriba de *mrkA* (Chen *et al*., 2011; Struve *et al*., 2009*).* Aquí se investigó el porcentaje de identidad de los genes de fimbrias encontrados en las cepas con respecto a cepas reportadas en estudios anteriores y en su mayoría el porcentaje de identidad con cada gen fue del 99% y no se encontraron en todas las cepas los genes *fimk, mrkH* y *mrkI*. A pesar de que existe evidencia del papel que juegan las fimbrias tipo I y tipo III en las infecciones del tracto urinario y la formación de biofilm en los catéteres, aún no se conoce si todas las cepas presentan esta diversidad alélica y si las diferencias que existen en los locus de ambas fimbrias tienen un impacto clínico. Como se mencionó anteriormente en el equipo de trabajo se detectan cepas de *K. pneumoniae* con apéndices filamentosos con características similares a los pili tipo IV, se identifica el gen *pilA* en estos aislamientos y se estudia su expresión en las cepas 003 y 021 (En este trabajo nombrada N021) (López-Reynoso, 2019). Anteriormente se identificó a la cepa N021 como *K. pneumoniae,* esto con base a la secuenciación del gen *rpoB* (López-Reynoso, 2019), sin embargo, en la WGS correspondió a una *K. quasipneumoniae,* por lo que los genes que codifican para los pili tipo IV también están presentes en especies distintas a *K. pneumoniae.* Aquí se encontraron los genes *pilA, pilB, pilC, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ* y *pilT,* a partir de la anotación con la herramienta RAST 2.0 y la búsqueda de motivos conservados con Pfam y NCBI Conserved Domain, sin embargo, el hecho de que no exista una referencia para el pili tipo IV para *Klebsiella* hace difícil la confirmación de identidad de estos genes.

Otro mecanismo de virulencia importante en *Klebsiella* son los sideróforos, que permiten tomar hierro del hospedero para poder subsistir en un determinado sitio. De los cuatro sistemas de sideróforos principales descritos en *K. pneumoniae,* únicamente se encontraron los genes necesarios que codifican para enterobactina. Encontrar este sideróforo en cepas hvKp y cKp es común, debido a que se encuentra

ubicado en el cromosoma de *Klebsiella*. En cambio, el sideróforo de aerobactina se encuentra en menos del 10% de los aislamientos de cepas clásicas y es común que se asocie con la hipervirulencia, debido a que los genes de aerobactina junto con el transportador *iutA* se ubican en un mismo plásmido de virulencia junto con *rmpA* (Pacsoza & Mecsas, 2016; Wyres *et al*., 2020). En las cepas de este estudio, se encontró únicamente el receptor para aerobactina *iutA,* pero no se encontraron los genes necesarios para su síntesis, por lo que es posible que el principal sideróforo que utilizan estas cepas sea enterobactina incluyendo la cepa de *K. quasipneumoniae,* aunque existen diferencias entre los alelos de cepas de *K. pneumoniae* y *K. quasipneumoniae*.

También se buscaron genes adicionales que se han descrito en *Klebsiella*, entre ellos el sistema de secreción tipo VI (T6SS). Este sistema fue descrito en diferentes bacterias como *Vibrio cholerae, Burkholderia* spp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella gallinarum* donde se destaca su importancia en la aptitud bacteriana en el ambiente, para la eliminación de competidores, detección de quórum y transferencia horizontal de genes, que puede estar codificado en 13 genes centrales organizados en diferentes segmentos del genoma (Alcofonado *et al*., 2015; Ho *et al*., 2014; Storey *et al*., 2020). En un estudio donde se investigó la diversidad del locus *T6SS* en las cepas ATCC 43816, NTUH-K2044, SGH10, NJST258_1 y MGH78578 de *K. pneumoniae*, se encontró que el locus I estaba presente en todas las cepas, y contuvo a genes esenciales para la construcción del T6SS, pero existió una gran diversidad en el número de efectores y proteínas inmunitarias en este locus, el locus II se encontró incompleto y se caracterizó por la presencia de *vgrG*, mientras que el locus III solo estuvo presente en las cepas ATCC43816 y MGH75878 (Storey *et al*., 2009). Lo que se encontró en este estudio fue algo similar, las cepas contenían genes esenciales para el T6SS en un primer locus y las cepas CM155 y CM175 además contenían dos locus incompletos y en todos se encontró a *vgrG*, mientras que en la cepa N021 solo se encontraron dos locus. La cepa N021 tenía codificado en el locus I un gen de resistencia a cefepime y en el locus dos un gen de fosfolipasa. Por otra parte, las cepas CM155 y CM175 tenían codificado una gran variedad de proteínas hipotéticas y genes que codifican para efectores putativos

como pyosina S. Poco es lo que se conoce sobre el comportamiento de *Klebsiella* en el ambiente, así como su competencia con otras especies, por lo que es interesante conocer el papel que tiene el T6SS, aunque su alta diversidad en el número de efectores en cada cepa lo hace una tarea difícil de realizar. Además del T6SS, se encontraron los genes de *hlyIII,* que codifican para una hemolisina reportada en cepas de *Bacillus cereus y Vibrio vulnificus* causantes de infecciones en heridas y sepsis, el locus *pgaABCD* que codifica para proteínas que pueden servir como adhesinas para el mantenimiento de la estabilidad estructural del biofilm. En la cepa N021 se encontraron los genes que codifican para KfuBC, que de acuerdo con la literatura es un sistema de transporte de hierro, el cual se encuentra asociado a la hipervirulencia en cepas de *K. pneumoniae,* esto se observó en estudios realizados en ratones, donde este gen tuvo relevancia para la formación de abscesos hepáticos (Hsieh *et al*., 2008).

11 CONCLUSIONES

- Las cepas resistentes a carbapenémicos mostraron diferentes bandas plasmídicas, relacionados a grupos de incompatibilidad distintos a IncN, donde los más prevalentes fueron IncFIC, IncFIA, IncY y CoelETp, no antes asociados con *bla*$_{VIM}$.

- Se determinó la especie correcta de la cepa N021 que correspondió a un aislamiento de *K. quasipneumoniae,* el cual se informa por primera vez proveniente de un hospital pediátrico de la Ciudad de Puebla.

- Se determinaron variantes de *fosA* no antes descritas y las cepas CM155 y CM175 portaron *bla*$_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, uno de ellos asociado a un plásmido de tipo IncN, donde la cepa CM175 perteneció a los clones problemáticos MDR del ST20 KL28, O1v2.

- Las cepas hipermucoides (KpE23, KpE46, KpE47, KpE49, KpE50, KpLC9, KpLC10, KpLC19 y KpN24) no portaron *magA, rmpA* o *rmpA2* relacionados con la hiperviscosidad de cepas hvKp. Se encontró una gran diversidad alélica en los genes que codifican para las fimbrias tipo I y tipo III, así como, el pili tipo IV y no todas las cepas seleccionadas tenían el mismo contenido de genes. Otros genes de virulencia estuvieron presentes entre ellos *KfuBC* reportado en cepas hvKp en la cepa N021.

12 PERSPERCTIVAS

- Aislar e identificar un mayor número de cepas de *Klebsiella* spp. provenientes de la comunidad.
- Continuar con la caracterización de plásmidos de las cepas resistentes a antibióticos, así como aisladas de la comunidad.
- Realizar la búsqueda del gen *bla*$_{VIM}$ en las bandas plasmídicas de las cepas resistentes a carbapenémicos.
- Realizar la búsqueda de antígenos capsulares, así como genes de virulencia en cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de hospitales y de la comunidad.
- Realizar un análisis bioinformático de la variabilidad de los genes que codifican para las fimbrias tipo I y III en un mayor número de cepas aisladas de diferentes sitios anatómicos.

13 REFERENCIAS

Alcántar-Curiel, M. D., Blackburn, D., Saldaña, Z., Gayosso-Vázquez, C., Iovine, N. M., De la Cruz, M. A., & Girón, J. A. (2013). Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence*, *4*(2), 129–138. https://doi.org/10.4161/viru.22974

Alcántar-Curiel, M. D., Ledezma-Escalante, C. A., Jarillo-Quijada, M. D., Gayosso-Vázquez, C., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Cedillo-Ramírez, M. L., Santos-Preciado, J. I., & Girón, J. A. (2018). Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed research international*, *2018*, 7012958. https://doi.org/10.1155/2018/7012958

Araújo, B. F., Ferreira, M. L., Campos, P. A., Royer, S., Gonçalves, I. R., da Fonseca Batistão, D. W., Fernandes, M. R., Cerdeira, L. T., Brito, C. S., Lincopan, N., Gontijo-Filho, P. P., & Ribas, R. M. (2018). Hypervirulence and biofilm production in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. *Journal of medical microbiology*, *67*(4), 523–528. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000711

Artyszuk, D., Izdebski, R., Maciejewska, A., Kaszowska, M., Herud, A., Szijártó, V., Gniadkowski, M., & Lukasiewicz, J. (2020). The Impact of Insertion Sequences on O-Serotype Phenotype and Its O-Locus-Based Prediction in *Klebsiella pneumoniae* O2 and O1. *International journal of molecular sciences*, *21*(18), 6572. https://doi.org/10.3390/ijms21186572

Bachman, M. A., Oyler, J. E., Burns, S. H., Caza, M., Lépine, F., Dozois, C. M., & Weiser, J. N. (2011). *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infection and immunity*, *79*(8), 3309–3316. https://doi.org/10.1128/IAI.05114-11

Bagley, S. (1985). Habitat Association of *Klebsiella* Species. Infection Control, 6(2), 52-58. doi:10.1017/S0195941700062603

Berry, G. J., Loeffelholz, M. J., & Williams-Bouyer, N. (2015). An Investigation into Laboratory Misidentification of a Bloodstream *Klebsiella variicola* Infection. *Journal of clinical microbiology*, *53*(8), 2793–2794. https://doi.org/10.1128/JCM.00841-15

Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Jones, L., Delannoy-Vieillard, A. S., Garin, B., Le Hello, S., Arlet, G., Nicolas-Chanoine, M. H., Decré, D., & Brisse, S. (2014). Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerging infectious diseases*, *20*(11), 1812–1820. https://doi.org/10.3201/eid2011.140206

Bowers, J. R., Kitchel, B., Driebe, E. M., MacCannell, D. R., Roe, C., Lemmer, D., de Man, T., Rasheed, J. K., Engelthaler, D. M., Keim, P., & Limbago, B. M. (2015). Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PloS one*, *10*(7), e0133727. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133727

Brisse, S., Passet, V., & Grimont, P. (2014). Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. quasipneumoniae subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *64*(Pt 9), 3146–3152. https://doi.org/10.1099/ijs.0.062737-0

Calbo, E., & Garau, J. (2015). The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future microbiology*, *10*(6), 1063–1075. https://doi.org/10.2217/fmb.15.22

Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *14 Suppl 1*, 144–153. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x

Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(6), 2227–2238. https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*, *63*(3), 219–228. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018

Catalán-Nájera, J. C., Barrios-Camacho, H., Duran-Bedolla, J., Sagal-Prado, A., Hernández-Castro, R., García-Méndez, J., Morfín-OteroMorfín-Otero, R., Velázquez-Larios, M., Ortíz-Navarrete, V., Gutierrez-Xicotencatl, L., Alpuche-Aranda, C., Silva-Sánchez, J., & Garza-Ramos, U. (2019). Molecular characterization and pathogenicity determination of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates serotype K2 in Mexico. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *94*(3), 316–319. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.013

Castanheira, M., Deshpande, L. M., Mendes, R. E., Rodriguez-Noriega, E., Jones, R. N., & Morfin-Otero, R. (2011). Comment on: role of changes in the L3 loop of the active site in the evolution of enzymatic activity of VIM-type metallo-β-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *66*(3), 684–686. https://doi.org/10.1093/jac/dkq393

Chang, Y. W., Rettberg, L. A., Treuner-Lange, A., Iwasa, J., Søgaard-Andersen, L., & Jensen, G. J. (2016). Architecture of the type IVa pilus machine. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6278), aad2001. https://doi.org/10.1126/science.aad2001

Chen, F. J., Chan, C. H., Huang, Y. J., Liu, K. L., Peng, H. L., Chang, H. Y., Liou, G. G., Yew, T. R., Liu, C. H., Hsu, K. Y., & Hsu, L. (2011). Structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 Fimbriae. *Journal of bacteriology*, *193*(7), 1718–1725. https://doi.org/10.1128/JB.01395-10

Chen, Y. T., Chang, H. Y., Lai, Y. C., Pan, C. C., Tsai, S. F., & Peng, H. L. (2004). Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*, *337*, 189–198. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.008

Chen, L., Chavda, K. D., Al Laham, N., Melano, R. G., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2013). Complete nucleotide sequence of a blaKPC-harboring

IncI2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(10), 5019–5025. https://doi.org/10.1128/AAC.01397-13

Chen, L., Chavda, K. D., Melano, R. G., Jacobs, M. R., Koll, B., Hong, T., Rojtman, A. D., Levi, M. H., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2014). Comparative genomic analysis of KPC-encoding pKpQIL-like plasmids and their distribution in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(5), 2871–2877. https://doi.org/10.1128/AAC.00120-14

Chen, Y., Marimuthu, K., Teo, J., Venkatachalam, I., Cherng, B., De Wang, L., Prakki, S., Xu, W., Tan, Y. H., Nguyen, L. C., Koh, T. H., Ng, O. T., & Gan, Y. H. (2020). Acquisition of Plasmid with Carbapenem-Resistance Gene bla_{KPC2} in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, Singapore. *Emerging infectious diseases*, *26*(3), 549–559. https://doi.org/10.3201/eid2603.191230

Cheng, D. L., Liu, Y. C., Yen, M. Y., Liu, C. Y., & Wang, R. S. (1991). Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Archives of internal medicine*, *151*(8), 1557–1559.

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

Chong, Y., Ito, Y., & Kamimura, T. (2011). Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *11*(7), 1499–1504. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.001

Cortés-Cortés G. (2016). Caracterización de la Resistencia antimicrobiana y tipificacion molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México. [Tesis de Doctorado Publicada]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Craig, L., Forest, K. T., & Maier, B. (2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature reviews. Microbiology*, *17*(7), 429–440. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4

Craig, L., Pique, M. E., & Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature reviews. Microbiology*, *2*(5), 363–378. https://doi.org/10.1038/nrmicro885

Deleo, F. R., Chen, L., Porcella, S. F., Martens, C. A., Kobayashi, S. D., Porter, A. R., Chavda, K. D., Jacobs, M. R., Mathema, B., Olsen, R. J., Bonomo, R. A., Musser, J. M., & Kreiswirth, B. N. (2014). Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(13), 4988–4993. https://doi.org/10.1073/pnas.1321364111

Doménech-Sánchez, A., Hernández-Allés, S., Martínez-Martínez, L., Benedí, V. J., & Albertí, S. (1999). Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, *181*(9), 2726–2732. https://doi.org/10.1128/JB.181.9.2726-2732.1999

Dorman, M. J., Feltwell, T., Goulding, D. A., Parkhill, J., & Short, F. L. (2018). The Capsule Regulatory Network of *Klebsiella pneumoniae* Defined by density-TraDISort. *mBio*, *9*(6), e01863-18. https://doi.org/10.1128/mBio.01863-18

El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie-biologie*, *61*(5), 209–216. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.004

Fang, C. T., Lai, S. Y., Yi, W. C., Hsueh, P. R., Liu, K. L., & Chang, S. C. (2007). *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *45*(3), 284–293. https://doi.org/10.1086/519262

Fang, C. T., Shih, Y. J., Cheong, C. M., & Yi, W. C. (2016). Rapid and Accurate Determination of Lipopolysaccharide O-Antigen Types in *Klebsiella pneumoniae* with a Novel PCR-Based O-Genotyping Method. *Journal of clinical microbiology*, *54*(3), 666–675. https://doi.org/10.1128/JCM.02494-15

Fischbach, M. A., Lin, H., Liu, D. R., & Walsh, C. T. (2005). In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(3), 571–576. https://doi.org/10.1073/pnas.0408463102

Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, K. E., & Thomson, N. R. (2016). The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial genomics*, *2*(8), e000073. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000073

Fung, C. P., Lin, Y. T., Lin, J. C., Chen, T. L., Yeh, K. M., Chang, F. Y., Chuang, H. C., Wu, H. S., Tseng, C. P., & Siu, L. K. (2012). *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. *Emerging infectious diseases*, *18*(8), 1322–1325. https://doi.org/10.3201/eid1808.111053

García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. 2009. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in Salmonella. J Antimicrob Chemother; 63:274-81.

García-Fernández, A., Villa, L., Carta, C., Venditti, C., Giordano, A., Venditti, M., Mancini, C., & Carattoli, A. (2012). *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(4), 2143–2145. https://doi.org/10.1128/AAC.05308-11

Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., Feliciano-Guzmán,

J. M., … Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PloS one*, *14*(3), e0209865. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865

Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Moreno-Domínguez, S., Toribio-Jiménez, J., Jardón-Pineda, D., Cuevas-Peña, J., Sánchez-Pérez, A., Duran-Bedolla, J., Olguín-Rodriguez, J., & Román-Román, A. (2018). Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New microbes and new infections*, *23*, 17–27. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.02.002

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Catalán-Nájera, J., Barrios, H., Rodríguez-Medina, N., Garza-González, E., Cevallos, M. A., & Lozano, L. (2016). Draft Genome Sequence of a Hypermucoviscous Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Clinical Isolate. *Genome announcements*, *4*(4), e00475-16. https://doi.org/10.1128/genomeA.00475-16

Gautom R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of clinical microbiology*, *35*(11), 2977–2980. https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2977-2980.1997

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *57*(Pt 1), 81–91. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0

Gorrie, C. L., Mirceta, M., Wick, R. R., Edwards, D. J., Thomson, N. R., Strugnell, R. A., Pratt, N. F., Garlick, J. S., Watson, K. M., Pilcher, D. V., McGloughlin, S. A., Spelman, D. W., Jenney, A., & Holt, K. E. (2017). Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *65*(2), 208–215. https://doi.org/10.1093/cid/cix270

Gu, D., Dong, N., Zheng, Z., Lin, D., Huang, M., Wang, L., Chan, E. W., Shu, L., Yu, J., Zhang, R., & Chen, S. (2018). A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet. Infectious diseases*, *18*(1), 37–46. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9

Guo, Q., Tomich, A. D., McElheny, C. L., Cooper, V. S., Stoesser, N., Wang, M., Sluis-Cremer, N., & Doi, Y. (2016). Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing Escherichia coli. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *71*(9), 2460–2465. https://doi.org/10.1093/jac/dkw177

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *29*(8), 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

Haeggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., & Brisse, S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(7), 2400–2408. https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2400-2408.2004

Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A. H., & Sørensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(9), 3332–3337. https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3332-3337.2004

Hsieh, P. F., Lin, T. L., Yang, F. L., Wu, M. C., Pan, Y. J., Wu, S. H., Wang, J. T. (2012). Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. PloS one, 7(3), e33155.

Hsieh, P. F., Lin, T. L., Lee, C. Z., Tsai, S. F., & Wang, J. T. (2008). Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *The Journal of infectious diseases*, *197*(12), 1717–1727. https://doi.org/10.1086/588383

Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Nguyen, K. V., Nguyen, T. V., Dao, T. T., Mensink, M., … Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(27), E3574–E3581. https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112

Hou, J., Huang, X., Deng, Y., He, L., Yang, T., Zeng, Z., Chen, Z., & Liu, J. H. (2012). Dissemination of the fosfomycin resistance gene fosA3 with CTX-M β-lactamase genes and rmtB carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(4), 2135–2138. https://doi.org/10.1128/AAC.05104-11

Huang, Y., Lin, Q., Zhou, Q., Lv, L., Wan, M., Gao, X., Wang, C., & Liu, J. H. (2020). Identification of *fosA10*, a Novel Plasmid-Mediated Fosfomycin Resistance Gene of *Klebsiella pneumoniae* Origin, in *Escherichia coli*. *Infection and drug resistance*, *13*, 1273–1279. https://doi.org/10.2147/IDR.S251360

Huang, Y. H., Chou, S. H., Liang, S. W., Ni, C. E., Lin, Y. T., Huang, Y. W., & Yang, T. C. (2018). Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *73*(8), 2039–2046. https://doi.org/10.1093/jac/dky164

Kieser T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from Streptomyces lividans and *Escherichia coli*. *Plasmid*, *12*(1), 19–36. https://doi.org/10.1016/0147-619x(84)90063-5

Lam, M., Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Fostervold, A., Holt, K. E., & Löhr, I. H. (2019). Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR

Klebsiella pneumoniae ST15. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *74*(5), 1218–1222. https://doi.org/10.1093/jac/dkz028

Lam, M., Wyres, K. L., Judd, L. M., Wick, R. R., Jenney, A., Brisse, S., & Holt, K. E. (2018). Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome medicine*, *10*(1), 77. https://doi.org/10.1186/s13073-018-0587-5

Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of clinical microbiology*, *50*(4), 1355–1361. https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11

Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Ofek, I., Carmeli, Y., & Navon-Venezia, S. (2010). Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *65*(2), 243–248. https://doi.org/10.1093/jac/dkp417

Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in microbiology*, *7*, 895. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895

Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *7*, 483. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483

Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z., & Hao, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial resistance and infection control*, *8*, 44. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0489-3

Liao, W., Long, D., Huang, Q., Wei, D., Liu, X., Wan, L., Feng, Y., Zhang, W., & Liu, Y. (2020). Rapid Detection to Differentiate Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) From Classical *K. pneumoniae* by Identifying *peg-344* With Loop-Mediated Isothermal Amplication (LAMP). *Frontiers in microbiology*, *11*, 1189. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01189

Lin, Y. T., Liu, C. J., Chen, T. J., Chen, T. L., Yeh, Y. C., Wu, H. S., Tseng, C. P., Wang, F. D., Tzeng, C. H., & Fung, C. P. (2011). Pyogenic liver abscess as the initial manifestation of underlying hepatocellular carcinoma. *The American journal of medicine*, *124*(12), 1158–1164. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.08.012

Liu, Y. C., Cheng, D. L., & Lin, C. L. (1986). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Archives of internal medicine*, *146*(10), 1913–1916.

Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K. M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutiérrez, C., Frank, C. G., Fernández-Carrasco, H., Insua, J. L., Salminen, T. A., Garmendia, J., & Bengoechea, J. A. (2015). Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(46), E6369–E6378. https://doi.org/10.1073/pnas.1508820112

Loli, A., Tzouvelekis, L. S., Tzelepi, E., Carattoli, A., Vatopoulos, A. C., Tassios, P. T., & Miriagou, V. (2006). Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *58*(3), 669–672. https://doi.org/10.1093/jac/dkl302

Long, S. W., Linson, S. E., Ojeda Saavedra, M., Cantu, C., Davis, J. J., Brettin, T., & Olsen, R. J. (2017). Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *mSphere*, *2*(4), e00290-17. https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00290-17

Long, S. W., Olsen, R. J., Eagar, T. N., Beres, S. B., Zhao, P., Davis, J. J., Brettin, T., Xia, F., & Musser, J. M. (2017). Population Genomic Analysis of 1,777 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Houston, Texas: Unexpected Abundance of Clonal Group 307. mBio, 8(3), e00489-17. https://doi.org/10.1128/mBio.00489-17

López-Reynoso, C. I. (2019). caracterización del pili tipo IV en aislados clínicos de *K. pneumoniae* [Tesis de Maestría Publicada]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Ma, Y., Wu, X., Li, S., Tang, L., Chen, M., & An, Q. (2021). Proposal for reunification of the genus Raoultella with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. *Research in microbiology*, 103851. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103851

Ma, Y., Xu, X., Guo, Q., Wang, P., Wang, W., & Wang, M. (2015). Characterization of fosA5, a new plasmid-mediated fosfomycin resistance gene in *Escherichia coli. Letters in applied microbiology*, *60*(3), 259–264. https://doi.org/10.1111/lam.12366

Martin, R. M., and Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004

Merino, S., Camprubí, S., Albertí, S., Benedí, V. J., & Tomás, J. M. (1992). Mechanisms of Klebsiella pneumoniae resistance to complement-mediated killing. *Infection and immunity*, *60*(6), 2529–2535. https://doi.org/10.1128/iai.60.6.2529-2535.1992

Miriagou, V., Papagiannitsis, C. C., Kotsakis, S. D., Loli, A., Tzelepi, E., Legakis, N. J., & Tzouvelekis, L. S. (2010). Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the blaVIM-1 metallo-beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(10), 4497–4502. https://doi.org/10.1128/AAC.00665-10

Mshana, S. E., Imirzalioglu, C., Hossain, H., Hain, T., Domann, E., & Chakraborty, T. (2009). Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC infectious diseases*, *9*, 97. https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-97

Navas, J., León, J., Arroyo, M., & García Lobo, J. M. (1990). Nucleotide sequence and intracellular location of the product of the fosfomycin resistance gene from transposon Tn2921. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *34*(10), 2016–2018. https://doi.org/10.1128/AAC.34.10.2016

Navon-Venezia, S., Hammer-Munz, O., Schwartz, D., Turner, D., Kuzmenko, B., & Carmeli, Y. (2003). Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum beta-lactamases among members of the family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. *Journal of clinical microbiology*, *41*(1), 155–158. https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.155-158.2003

Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, *41*(3), 252–275. https://doi.org/10.1093/femsre/fux013

Oteo, J., Cuevas, O., López-Rodríguez, I., Banderas-Florido, A., Vindel, A., Pérez-Vázquez, M., Bautista, V., Arroyo, M., García-Caballero, J., Marín-Casanova, P., González-Sanz, R., Fuentes-Gómez, V., Oña-Compán, S., García-Cobos, S., & Campos, J. (2009). Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *64*(3), 524–528. https://doi.org/10.1093/jac/dkp211

Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *80*(3), 629–661. https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15

Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J. A., & Albertí, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(1), 177–183. https://doi.org/10.1128/AAC.00715-09

Pakharukova, N., Garnett, J. A., Tuittila, M., Paavilainen, S., Diallo, M., Xu, Y., Matthews, S. J., & Zavialov, A. V. (2015). Structural Insight into Archaic and Alternative Chaperone-Usher Pathways Reveals a Novel Mechanism of Pilus Biogenesis. *PLoS pathogens*, *11*(11), e1005269. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005269

Papagiannitsis, C. C., Dolejska, M., Izdebski, R., Dobiasova, H., Studentova, V., Esteves, F. J., Derde, L. P., Bonten, M. J., Hrabák, J., & Gniadkowski, M. (2015). Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 β-Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*(8), 5065–5068. https://doi.org/10.1128/AAC.00937-15

Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(11), 3953–3955. https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06

Patro, L., & Rathinavelan, T. (2019). Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *9*, 367. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00367

Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy*, *11*(3), 297–308. https://doi.org/10.1586/eri.13.12

Pérez-Sánchez, M. A. (2020). Determinación fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de diferentes hospitales mexicanos. [Tesis de Licenciatura Publicada]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Philippon, A., Slama, P., Dény, P., & Labia, R. (2016). A Structure-Based Classification of Class A β-Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical microbiology reviews*, *29*(1), 29–57. https://doi.org/10.1128/CMR.00019-15

Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother; 41:2188-95.

Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. (2012). Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(1), 559–562. https://doi.org/10.1128/AAC.05289-11

Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(1), 15–22. https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004

Pusz, P., Bok, E., Mazurek, J., Stosik, M., & Baldy-Chudzik, K. (2014). Type 1 fimbriae in commensal Escherichia coli derived from healthy humans. *Acta biochimica Polonica*, *61*(2), 389–392.

Ramaswamy, V. K., Vargiu, A. V., Malloci, G., Dreier, J., & Ruggerone, P. (2017). Molecular Rationale behind the Differential Substrate Specificity of Bacterial RND Multi-Drug Transporters. *Scientific reports*, *7*(1), 8075. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08747-8

Rodrigues, C., Passet, V., Rakotondrasoa, A., & Brisse, S. (2018). Identification of *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella quasipneumoniae, Klebsiella variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3000. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03000

Rodrigues, C., Passet, V., Rakotondrasoa, A., Diallo, T. A., Criscuolo, A., & Brisse, S. (2019). Description of Klebsiella africanensis sp. nov., Klebsiella variicola subsp. tropicalensis subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov. *Research in microbiology*, *170*(3), 165–170. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.02.003

Rosen, D. A., Pinkner, J. S., Jones, J. M., Walker, J. N., Clegg, S., & Hultgren, S. J. (2008). Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infection and immunity*, *76*(7), 3337–3345. https://doi.org/10.1128/IAI.00090-08

Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., & Torres, C. (2012). qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in Escherichia coli and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *67*(4), 886–897. https://doi.org/10.1093/jac/dkr548

Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology reviews*, *32*(3), e00001-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19

Russo, T. A., Olson, R., Fang, C. T., Stoesser, N., Miller, M., MacDonald, U., Hutson, A., Barker, J. H., La Hoz, R. M., & Johnson, J. R. (2018). Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, *56*(9), e00776-18. https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18

Russo, T. A., Olson, R., MacDonald, U., Beanan, J., & Davidson, B. A. (2015). Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. *Infection and immunity*, *83*(8), 3325–3333. https://doi.org/10.1128/IAI.00430-15

Jagnow J, Clegg S. (2003). *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology 149:2397–2405. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26434-0.

Secretaria de Salud, Dirección General de Epidemiología. (2017). *Informe Anual 2015, Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica RHOVE*.

Satlin, M. J., Chen, L., Patel, G., Gomez-Simmonds, A., Weston, G., Kim, A. C., Seo, S. K., Rosenthal, M. E., Sperber, S. J., Jenkins, S. G., Hamula, C. L., Uhlemann, A. C., Levi, M. H., Fries, B. C., Tang, Y. W., Juretschko, S., Rojtman, A. D., Hong, T., Mathema, B., Jacobs, M. R., … Kreiswirth, B. N. (2017). Multicenter Clinical and Molecular Epidemiological Analysis of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in the CRE Epicenter of the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(4), e02349-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02349-16

Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., & Klemm, P. (2005). Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, *73*(8), 4626–4633. https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005

Siu, L. K., Yeh, K. M., Lin, J. C., Fung, C. P., & Chang, F. Y. (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *The Lancet. Infectious diseases*, *12*(11), 881–887. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70205-0

Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*, *76*(9), 4055–4065. https://doi.org/10.1128/IAI.00494-08

Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity*, *77*(11), 5016–5024. https://doi.org/10.1128/IAI.00585-09

Storey, D., McNally, A., Åstrand, M., Sa-Pessoa Graca Santos, J., Rodriguez-Escudero, I., Elmore, B., Palacios, L., Marshall, H., Hobley, L., Molina, M., Cid, V. J., Salminen, T. A., & Bengoechea, J. A. (2020). *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS pathogens*, *16*(3), e1007969. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007969

Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carta, C., & Carattoli, A. (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *67*(7), 1645–1650. https://doi.org/10.1093/jac/dks114

Walker, K. A., Miner, T. A., Palacios, M., Trzilova, D., Frederick, D. R., Broberg, C. A., Sepúlveda, V. E., Quinn, J. D., & Miller, V. L. (2019). A *Klebsiella pneumoniae* Regulatory Mutant Has Reduced Capsule Expression but Retains Hypermucoviscosity. *mBio*, *10*(2), e00089-19. https://doi.org/10.1128/mBio.00089-19

Walker, K.A., & Miller, V. (2020). The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Current opinion in microbiology, 54*, 95-102.

Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. (2018). Kaptive Web: user-friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. J Clin Microbiol 56: e00197-18. https://doi.org/10.1128/JCM.00197-18.

World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics (WHO, 2020).

Wu, K. M., Li, L. H., Yan, J. J., Tsao, N., Liao, T. L., Tsai, H. C., Fung, C. P., Chen, H. J., Liu, Y. M., Wang, J. T., Fang, C. T., Chang, S. C., Shu, H. Y., Liu, T. T., Chen, Y. T., Shiau, Y. R., Lauderdale, T. L., Su, I. J., Kirby, R., & Tsai, S. F. (2009). Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *Journal of bacteriology*, *191*(14), 4492–4501. https://doi.org/10.1128/JB.00315-09

Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & 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

Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current opinion in microbiology*, *45*, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004

Wyres, K. L.,Wick, R. R., Gorrie, C., Jenney, A., Follador, R., Thomson, N. R., et al. (2016). Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genoma data. Microb. Genom. 2: E000102. doi: 10.1099/mgen.0.000102

Yang, X., Dong, N., Chan, E. W., Zhang, R., & Chen, S. (2021). Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in microbiology*, *29*(1), 65–83. https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.012

Yang, X., Wai-Chi Chan, E., Zhang, R., & Chen, S. (2019). A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature microbiology*, *4*(12), 2039–2043. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0566-7

Ye, M., Tu, J., Jiang, J., Bi, Y., You, W., Zhang, Y., Ren, J., Zhu, T., Cao, Z., Yu, Z., Shao, C., Shen, Z., Ding, B., Yuan, J., Zhao, X., Guo, Q., Xu, X., Huang, J., & Wang, M. (2016). Clinical and Genomic Analysis of Liver Abscess-Causing *Klebsiella*

pneumoniae Identifies New Liver Abscess-Associated Virulence Genes. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *6*, 165. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00165

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(12), 5046–5054. https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09

Zhan, L., Wang, S., Guo, Y., Jin, Y., Duan, J., Hao, Z., Lv, J., Qi, X., Hu, L., Chen, L., Kreiswirth, B. N., Zhang, R., Pan, J., Wang, L., & Yu, F. (2017). Outbreak by Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates with Carbapenem Resistance in a Tertiary Hospital in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *7*, 182. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00182

Zhang, Y., Zeng, J., Liu, W., Zhao, F., Hu, Z., Zhao, C., Wang, Q., Wang, X., Chen, H., Li, H., Zhang, F., Li, S., Cao, B., & Wang, H. (2015). Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China. *The Journal of infection*, *71*(5), 553–560. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.07.010

14 ANEXOS

14.1 Datos de las cepas utilizadas para la comparación de las secuencias genéticas y aminoacídicas de las adhesinas fimbriales.

Cepa	Especie	Origen de la muestra	No. Acceso
NTUH-K2044	*K. pneumoniae*	Hemocultivo	AP006725
MGH78578	*K. pneumoniae*	Esputo	CP000647.1
C3091	*K. pneumoniae*	Orina	EU682505.2
KqPF26	*K. quasipneumoniae*	Orina	CP065838.1
KPC142	*K. quasipneumoniae*	Secreción traqueal	CP023478.1
A708	*K. quasipneumoniae*	Hemocultivo	CP026368.1
ATCC 700603	*K. quasipneumoniae*	Orina	CP029597.1

14.2 Análisis de calidad de las lecturas obtenido con FastQC

Para evaluar la calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación con Ilumina, se utilizó la herramienta FastQC. A continuación, se muestra el resumen de los parámetros de calidad evaluados y los resultados del análisis.

14.3 Resultados del análisis de calidad de los ensambles obtenidos con SPAdes 3.9 y Velvet 1.2.10 obtenido con Quast

	Cepa	N021	CM155	CM175
Ensambladores	Velvet 1.2.10			
	#contigs	57	59	64
	N50	281964	350444	468516
	SPAdes 3.9			
	#contigs	89	83	79
	N50	155017	183538	348492
	Longitud	5580353 bp	5403938 bp	5543958 bp

14.4 Propiedades de proteínas putativas de la cepa N021

La búsqueda de los motivos conservados se obtuvo con las herramientas Pfam y NCBI Conserved Domain.

N021	TAMAÑO (aa)	LOCALIZACIÓN	MOTIVOS CONSERVADOS
pilA	143	Extracelular/ Periplasma	Prokaryotic N-terminal methylation motif/ Pilin (bacterial filament)
pilB	461	Citoplasma	Type II/IV secretion system protein/ Type II secretion system (T2SS), protein E, N-terminal domain
pilC	401	Membrana interna	Type II secretion system (T2SS), protein F
pilM	266	Membrana interna/ Citoplasma/ Periplasma	Type IV pilus assembly protein PilM
pilN	177	Periplasma	Fimbrial assembly protein (PilN)
pilO	142	Membrana interna/ Periplasma	Ninguna coincidencia
pilP	126	Periplasma	DNA utilization proteins HofP
pilQ	414	Membrana externa	Bacterial type II and III secretion system protein
pilT	236	Citoplasma	Type II/IV secretion system protein

14.5 Propiedades de proteínas putativas de la cepa CM155 y CM175

La búsqueda de los motivos conservados se obtuvo con las herramientas Pfam y NCBI Conserved Domain

CM155/ CM175	TAMAÑO (aa)	LOCALIZACIÓN	MOTIVOS CONSERVADOS
pilA	143	Extracelular/ Periplasma/ Membrana interna/	Prokaryotic N-terminal methylation motif/ Pilin (bacterial filament)
pilB	461	Citoplasma	Type II/IV secretion system protein/ Type II secretion system (T2SS), protein E, N-terminal domain
pilC	401	Membrana interna	Type II secretion system (T2SS), protein F
pilM	266	Membrana interna	Type IV pilus assembly protein PilM
pilN	177	Periplasma	Fimbrial assembly protein (PilN)
pilO	142	Membrana interna/ Periplasma/ Citoplasma	Ninguna coincidencia
pilP	-	-	-
pilQ	414	Membrana externa	Bacterial type II and III secretion system protein
pilT	236	Citoplasma	Type II/IV secretion system protein