BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

Obtención de la mutante en el gen *pilA* del pili tipo IV de *Klebsiella pneumoniae*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

LBM. Denisse Ramírez Mendoza

ASESORA DE TESIS

D. C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

PUEBLA, PUE. **ENERO, 2020**

A mi mamá, a mi papá y a mi hermana, gracias por todo su apoyo incondicional, todos sus consejos, brindarme su confianza y sobre todo incentivarme para que luche por toda meta que me proponga.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, la Dra. Clauidia Fabiola Martínez de la Peña, por haberme aceptado y darme la oportunidad de realizar el proyecto.

A mi comité revisor por haberme brindado su apoyo y aportación de ideas a este trabajo.

A todos mis profesores, por todo su conocimiento brindado ya que me ha ayudado en mi formación académica.

Al Laboratorio de Interacción Bacteria- Planta, al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Cominidad y al Dr.Miguel Catañeda Lucio por el apoyo de equipo y material para este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio (Elsy, Montse, Nain, Mechita, Nancy, Dani, Aldo, Josue, Samuel y Edith que a lo largo de este trabajo he conocido, por los momentos y horas de trabajo que hemos compartido, por hacer más ameno el ambiente del laboratorio, por sus consejos, amistad, apoyo y ayudarme a resolver dudas.

Agradezco en especial a Iván por alentarme, por toda su ayuda, asesoría en este trabajo, consejos, compañía, amistad, por el cariño, amor y apoyo constante en todo momento.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT con el número de becario 847367 por el apoyo bindado para el desarrollo del proyecto.

Convivio del laboratorio de Biología Molecular de Enteropátogenos

Después de todo el esfuerzo, de todo el sacrificio, llega la dulce victoria, que solo es otra etapa en el camino

(Anónimo)

ÍNDICE

I.-INTRODUCCIÓN 1
I.1.- MODELO DE ESTUDIO: *Klebsiella pneumoniae* 2
I.2.- EPIDEMIOLOGÍA 5
1.3.- RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS 7
I.4.- FACTORES DE VIRULENCIA 9
I.4.1.- CÁPSULA 10
I.4.2.-PILIS TIPO 1 Y 3 12
I.4.3.- LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) 13
I.4.4.- SIDERÓFOROS 14
I.5 PILI TIPO IV (PT4) 17
1.5.1.-PILINA principal 21
I.6.- MUTACIÓN POR LAMBDA RED 24
II.-ANTECEDENTES 26
II.1.- ANTECEDENTES DIRECTOS 28
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 30
IV.-JUSTIFICACIÓN 30
V.- OBJETIVO GENERAL 31
V.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
VI.- HIPÓTESIS 31
VII.- MATERIALES Y MÉTODOS 32
VII.1.-Tabla 1. Material Biológico: 32
VII.2.- Condiciones de cultivo 33
VII.3.- Mantenimiento de las cepas 33
VII.4.- Condiciones de amplificado del gen *shv* para *Klebsiella pneumoniae* 33
VII.5.- Extracción de plásmido 34
VII.6.- Clonación 35
VII.7.- Transformación por choque térmico en células químicamente competentes 35

VII.8.- Transformación mediante electroporación del plásmido pKD46ΩTc^R en *K. pneumoniae* cepas 003 y ATCC13883 36
VII.9.- PCR por colonia 37
VII.10.- PCR del producto *pilA*/Km^R 39
VII.11.- Condiciones de PCR para amplificar *tetA* 40
VII.12.- Condiciones de PCR para amplificar *tetB* 41
VII.13.- Condiciones de PCR para amplificar *catA1* 42
VIII.- ESQUEMA EXPERIMENTAL 43
IX. RESULTADOS 44
IX. 1.- Análisis del contexto genético de la secuencia *pilA* 44
IX. 2.- Confirmación como *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* de la cepas 003 (aislado clínico) y la cepa ATCC 13883 (cepa de referencia) 46
IX. 3.- Extracción de plásmido de las cepas de *K. pneumoniae* 003 y ATCC 13883 49
IX. 4.- Diseño de Oligonucleótidos para amplificar el cassete de resistencia a tetraciclina y para amplificar el producto de PCR *pilA*/Km^R para la mutación por el sistema lambda red 50
IX. 5.- Construcción del vector pKD46ΩTc^R 52
IX. 6.- Amplificación del producto de PCR *pilA*/Km^R para la mutación por el sistema lambda red 57
IX. 7.- Funcionalidad de la herramienta (pKD46ΩTc^R) generando la mutación del gen *pilA* de *Klebsiella pneumoniae* 58
IX. 8-.Amplificación por PCR del gen *catA1* (cloranfenicol) en las cepas 003 y ATCC13883 60
X.- DISCUSIÓN 62
XI.- CONCLUSIONES 68
XII.- PERSPECTIVAS 68
XIII.-ANEXOS 69
XIV. BIBLIOGRAFIA 73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de células de *K. pneumoniae*…… 3

Figura 2. Cuatro factores de virulencia bien caracterizados en cepas de *K. pneumoniae* clásicas e hipervirulentas (hvKP)……. 16

Figura 3. Pili tipo IV en *Neisseria meningitidis*……...17

Figura 4. Proteínas necesarias para el ensamblaje del pili tipo IV……21

Figura 5. Prototipo del PT4 en *Neisseria gonorrhoeae* PilE…….23

Figura. 6. Sistema de recombinación lambda red……...26

Figura 7. Alineamiento de la secuencia de PilA de *K. pneumoniae* cepa 003……...29

Figura 8. Protocolo para PCR del gen *shv*……34

Figura 9. Protocolo para PCR del cassete de resistencia a tetraciclina (Tc^R)…….....38

Figura 10. Protocolo para PCR del producto *pilA*/Km^R……39

Figura 11. Protocolo para PCR del producto *tetA*……..40

Figura 12. Protocolo para PCR del producto *tetB*……..41

Figura 13. Protocolo para PCR del producto *catA1*. ……42

Figura 14(a). Contexto genético de la secuencia de la pilina……44

Figura 14(b). Diagrama del contexto genético de la secuencia de la pilina (KP_08290)……..44

Figura 15. Tabla de relación de la proteína GspE del sistema de secreción tipo II……..45

Figura 16. Pruebas bioquímicas de la cepa *K. pneumoniae* 003……..47

Figura 17. Pruebas bioquímicas de la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883……...48

Figura 18. Amplificación del gen *shv* de las cepas 003 y ATCC 13883……..49

Figura 19. Extracción de plásmido de las cepas 003 y ATCC 13883……50

Figura 20. Esquema de diseño de los oligonucleótidos para amplificar el cassete de tetraciclina….51

Figura 21. Esquema de diseño de los oligonucleótidos para la mutación por el sistema lambda red….....52

Figura 22. Restricción del plásmido pKD46 y restricción del plásmido pBSL193……..54

Figura 23. Comprobación de la construcción pKD46ΩTc^R por PCR……54

Figura 24. Extracción de plásmido de las posibles clonas ……..55

Figura 25. Comprobación de la construcción pKD46ΩTcR por restricción……55

Figura 26. Plásmido pKD46 y plásmido pKD46ΩTc^{R}……56

Figura 27. Amplificación del producto de PCR *pilA*/Km^{R}……..57

Figura 28. Colonias después de la electroporación en las cepas 003 y ATCC13883, así como en el control positivo y negativo ……59

Figura 29. Colonias después de la electroporación en las cepas 003 y ATCC13883, así como en el control positivo y negativo con 50 μg/μl de Tc……59

Figura 30. Amplificación por PCR de los genes *tetA* y *tetB*..……60

Figura 31. Crecimiento de las cepas 003 y ATCC 13883 en cloranfenicol……61

Figura 32. Amplificación por PCR del gen *catA1*……...61

INDICE DE TABALAS

Tabla 1. Material Biológico……...……32

Tabla 2. Resultado de las pruebas bioquímicas de la cepa 003 y ATCC 13883……..……..47

ABREVIATURAS

- IH — Infecciones hospitalarias
- PLA (por sus siglas en inglés) — Absceso hepático piógeno
- mM — Milimolar
- µl — Microlitro
- rpm — Revoluciones por minuto
- DO — Densidad Optica
- TDE — Tridestilada
- pb — pares de bases
- CMI — Concentración mínima inhibitoria
- SHV — Sulfhidrilo variable
- PCR (por sus siglas en inglés) — Reacción en cadena de la polimerasa
- UCI — Unidad de cuidados intensivos
- PT4 — Pili tipo IV
- Tc — Tetraciclina
- KPC — *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas
- HAIs (por sus siglas en inglés) — Infecciones adquiridas en el Hospital
- VAP (por sus siglas en inglés) — Neumonía asociada al ventilador
- BSI (por sus siglas en inglés) — Infecciones del torrente sanguíneo
- ESBL (por sus siglas en inglés) — Betalactamasas de espectro extendido
- CDC (por sus siglas en inglés) — Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
- MDR (por sus siglas en inglés) — Resistencia a múltiples fármacos
- HV — Hipervirulentas
- hvKP — Hipervirulenta (hipermucoviscosa) de *Klebsiella pneumoniae*

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es una bacteria aislada frecuentemente de una gran variedad de fuentes ambientales como suelo, vegetación y agua, incluso forma parte de la microbiota en humanos y animales. Sin embargo, también es un agente infeccioso severo asociado a infecciones graves adquiridas en el hospital como neumonía, septicemia e infecciones del tracto urinario entre otras. *K. pneumoniae* afecta a pacientes inmunocomprometidos, sanos, neonatos y ancianos. Actualmente es uno de los patógenos más resistente a múltiples fármacos por la adquisición de genes de resistencia, limitando con ello las opciones de tratamiento. Previo a este estudio en nuestro grupo de trabajo se aislaron cepas de *K. pneumoniae* a partir de muestras de sangre de pacientes con sepsis neonatal, el análisis de estas cepas (021 y 003) por microscopia electrónica de transmisión (TEM) reveló la presencia de una estructura filamentosa que se asemeja a un pili tipo IV, el gen *pilA* (pilina putativa) fue amplificado por PCR y su expresión fue determinada por RT-PCR.

Para comprender un poco más el papel de la pilina en el pili tipo IV de *K. pneumoniae*, nuestro objetivo fue construir una mutación del gen *pilA* en la cepa 003 usando el sistema lambda red con el plásmido pKD46. Este plásmido termosensible expresa el operón del sistema lambda red que codifica tres componentes bajo el control de un promotor inducible: Redγ (gam), Redα (exo) y Redβ (bet). Estos componentes permiten la recombinación homóloga entre el gen de interés (*pilA*) y un producto de PCR que contiene el casete de resistencia a la kanamicina y una región homóloga del gen diana (*pilA*). El pKD46 tiene un casete de resistencia a la ampicilina y *K. pneumoniae* es intrínsecamente resistente a este antibiótico, lo que hizo necesario adaptar esta herramienta de mutagénesis para *K. pneumoniae*. Para ese fin, se clonó un cassete de resistencia a tetraciclina en el plásmido pKD46 interrumpiendo el casete de ampicilina, obteniendo la nueva construcción pKD46ΩTc^{R}. Al probar la funcionalidad de la herramienta (pKD46ΩTc^{R}) se obtuvieron colonias en las cepas 003 y ATCC13883, como en los controles positivos y negativos, creando conflicto pues el control negativo no debería crecer en tetraciclina, esto dificultó la selección de las cepas. Por otro lado, se comprobó por PCR que las cepas empleadas de *K. pneumoniae* poseen bombas de expulsión para tetraciclina, confieriendoles resistencia por este mecanismo. Por lo cual se proponen otras alternativas para la mutación del gen *pilA*.

I.-INTRODUCCIÓN

Klebsiella spp. es una bacteria ubicua en la naturaleza, teniendo dos hábitats principales. Uno, el ambiente donde se encuentran en suelo, plantas, aguas superficiales y aguas residuales (Matsen *et. al,* 1974; Seidler *et. al,* 1975) y el otro en las superficies mucosas de mamíferos como caballos, cerdos y en los seres humanos colonizando nasofaringe y el tracto gastrointestinal (Podschun and Ullmann, 1998; Martin and Bachman, 2018).

Es importante señalar que la tasa de colonización por *Klebsiella* spp. se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, por ejemplo en materia fecal es del 77% y en la faringe del 19% (Echeverri and Cataño, 2010). Esto se debe a que esta especie se disemina a través del contacto de persona a persona (entre los trabajadores de la salud y los pacientes), siendo las manos de los trabajadores de la salud una fuente importante de transmisión (42%) (Casewell and Phillips, 1977; Jarvis *et. al,* 1985). Además los equipos médicos y entornos contaminados también juegan un papel en la diseminación de esta bacteria (Jarvis *et. al*, 1985; Podschun and Ullmann, 1998; Runcharoen *et. al*, 2017). Esta diseminación intrahospitalaria es directamente proporcional a la duración de la estancia y especialmente a la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre la flora comensal. *K. pneumoniae* se considera una de las principales bacterias asociada con infecciones nosocomiales y esla especie médicamente más importante del género. Además, *K. oxytoca* también se ha aislado de muestras clínicas humanas aunque en menor grado (Paczosa and Mecsas, 2016).

Se cree que la interacción de *K. pneumoniae* con las superficies de las células epiteliales y la capacidad para evadir los mecanismos de defensa inmune innatos es el primer paso en la colonización y el establecimiento exitoso de la infección en el huésped. Por lo tanto, como muchos otros patógenos, *K. pneumoniae* ha desarrollado varias estrategias de contraataque y evasión, codificando varios factores de virulencia que le ayudan a sobrevivir dentro del huésped. Sin embargo, varios estudios de adhesión e invasión con líneas celulares humanas revelaron que cepas de *K. pneumoniae* de origen ambiental en general no difieren de las cepas clínicas (Struve and Krogfelt, 2004; Clegg and Murphy, 2016).

Actualmente *K. pneumoniae* es uno de los patógenos más resistente a múltiples fármacos por la adquisición de genes de resistencia. Se han encontrado algunos aislados clínicos de *K. pneumoniae* que son resistentes a todos los antibióticos disponibles, limitando las opciones de tratamiento para las infecciones causadas por dicho microorganismo. Además, la rápida propagación geográfica de los aislamientos resistentes y la propagación de genes de resistencia a otros patógenos son motivo de especial preocupación. Si bien los diferentes métodos de tipificación son herramientas epidemiológicas útiles para el control de infecciones, todavía sabemos poco acerca de cómo esta bacteria puede causar enfermedades (Broberg *et. al,* 2014).Durante muchos años se han estudiado los factores de virulencia asociados a *K. pneumoniae*, sin embargo, se ha visto que existen nuevos factores que aún no están completamente caracterizados. Por lo que es importante investigar e identificar nuevos factores, además de comprender mejor los mecanismos de acción por los cuales *K. pneumoniae* puede sobrevivir dentro del huésped humano, para así encontrar nuevos blancos terapéuticos y tratar las diversas infecciones causadas por esta bacteria multirresistente (Doorduijn, *et. al*, 2016).

I.1.- MODELO DE ESTUDIO: *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria aislada por primera vez de pulmones de pacientes que murieron de neumonía en 1882 por Karl Friedländer. Desde ahí ha sido conocida por los médicos como el patógeno que causa la "neumonía de Friedländer". Esta bacteria encapsulada, inicialmente llamada bacilo de Friedländer, fue rebautizada como *Klebsiella* en 1886 (Friedländer, 1882). *K. pneumoniae* es un patógeno miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, además es miembro del grupo de bacterias de importancia hospitalaria ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* spp.). *K. pneumoniae* es un microorganismo aerobio, Gram negativo, encapsulado, no móvil, en forma de bacilo que mide aproximadamente 0.5 – 2 μm, que causa una amplia variedad de infecciones hospitalarias (Johnson, 2018) (Figura 1). En un estudio reciente se demostró que existen aislados clínicos de esta bacteria que presentan movilidad mediada por flagelo (Carabarin *et. al,* 2016). Aunque se considera que es un patógeno extracelular, se ha demostrado la

capacidad de *K. pneumoniae* para invadir células epiteliales cultivadas (Oelschlaeger and Tall, 1997). Crece aeróbicamente utilizando glucosa y sus derivados como fuentes de carbono, fermenta la lactosa, es oxidasa negativo, ureasa positivo y como anaerobio facultativos reduce el nitrato como aceptor final de electrones (Podschun and Ullmann, 1998; Johnson, 2018). En los medios de agar, presenta un fenotipo mucoide conferido por la cápsula de polisacárido característica de las bacterias de este género y única entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Sahly and Podschun, 1997; Martin and Bachman, 2018).

Figura 1. Microfotografía electrónica de células de *K. pneumoniae* rodeada de gruesas capas de material que constituyen la capsular fibrilar, también se pueden observar leucocitos polimorfomucleares (PMN) (Fuente: Johnson, 2018).

Existen tres filogrupos distintos de *K. pneumoniae* (KpI, KpII, y KpIII) que han sido definidos sobre la base de la secuenciación de un pequeño número de genes (Fevre *et. al*, 2005) y se ha propuesto que estos filogrupos sean reclasificados como especies distintas. A saber, *K. pneumoniae* (KpI), *K. quasipneumoniae* (KpII) y *K. variicola* (KpIII). Sin embargo, las tres causan infecciones en humanos (Brisse and Verhoef, 2001). Además, *K. pneumoniae* (KpI), la especie más frecuentemente asociada con infección humana, presenta más de 150 linajes profundamente ramificados, incluidos numerosos clones resistentes a múltiples fármacos o hipervirulentos (Holt *et. al,* 2015). Generalmente hay un conjunto de genes que se conserva entre todos los miembros. Este conjunto de genes se considera el

genoma central. En *K. pneumoniae*, se estima que el genoma central está presente en > 95% de los aislamientos y está compuesto por aproximadamente 2,000 genes (Holt *et. al,* 2015). Los genes que varían entre aislamientos constituyen el genoma accesorio. Dado que el genoma de *K. pneumoniae* varíatípicamente entre 5,000 y 6,000 genes, significa que en su mayoría está compuesto por genes accesorios. Los genes accesorios se adquirieron por transferencia horizontal entre especies bacterianas y están constituídos por islas cromosómicas, y/o por plásmidos, en ambos elementos genéticos se encuentran genes que pueden codificar factores de virulencia específicos y/o mecanismos de resistencia a antibióticos (Chung The *et. al,* 2015; Bi *et. al,* 2015). Esta plasticidad genética le da un éxito particular en la adaptación a diferentes nichos (Zhang *et. al,* 2011; Martin and Bachman, 2018). *Klebsiella pneumoniae* es una de las causas principales de infecciones hospitalarias (IH) y sepsis neonatal a nivel mundial (Jarvis *et. al,* 1985; Jones, 2010). *K. pneumoniae* es considerada como un patógeno oportunista, ya que puede encontrarse de forma asintomática en el tracto intestinal, la piel, la nariz y la garganta de individuos sanos pero también puede causar una variedad de infecciones en pacientes hospitalizados como son neumonía, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones relacionadas con el catéter e infecciones del tracto urinario (Podschun and Ullmann, 1998**;** Brisse *et. al,* 2006; Lin *et. al,* 2010; Holt *et. al,* 2015; Clegg and Murphy, 2016). *K. pneumoniae* ha surgido como un agente infeccioso severo que se asocia con infecciones graves como el absceso hepático piógeno (PLA, por sus siglás en inglés) que se complica con infecciones metastásicas que incluyen endoftalmitis, meningitis, absceso cerebral, absceso pulmonar, absceso esplénico, embolia pulmonar séptica, osteomielitis, etc. (Sahly and Podschun, 1997; Podschun and Ullmann, 1998; Lin *et. al,* 2010; Vuotto *et. al,* 2014; Kamal *et. al,* 2017). Varios grupos de pacientes son particularmente susceptibles a la infección, incluidos los del sudeste asiático, los hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, la estancia prolongada en hospitales, neonatos, ancianos, inmunocomprometidos y los que tienen enfermedades debilitantes de base, como diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y aquellos con enfermedad hepatobiliar, además el consumo previo de antibióticos (Kamal *et. al,* 2017; Echeverri and Cataño, 2010; Paczosa and Mecsas, 2016).

Actualmente ha surgido una nueva variante hipervirulenta (hipermucoviscosa) de *Klebsiella pneumoniae* (hvKP). Descrita por primera vez a mediados de los años ochenta y noventa en

el Pacífico asiático, ahora se reconoce cada vez más en los países occidentales. Los rasgos que mejoran su virulencia en comparación con las cepas clásicas de *K. pneumoniae* es la capacidad de adquirir hierro de manera más eficiente y una mayor expresión del material capsular lo que confiere el fenotipo hipermucoviscoso (Fang *et. al*, 2007; Kamal *et. al*, 2017 Shon *et. al*, 2013; Martin and Bachman, 2018; Russo *et. al*, 2011).

Las características clínicas asociadas a esta nueva variante son la capacidad de causar infecciones graves potencialmente mortales adquiridas en la comunidad y en huéspedes sanos jóvenes. Entre las infecciones causadas se encuentran las infecciones biliares, osteomielitis, endoftalmitis, abscesos pulmonares, PLA e infecciones del torrente sanguíneo (Shon *et. al*, 2013; Patel *et. al*, 2014; Vuotto *et. al*, 2014; Doorduijn, *et. al*, 2016). Los factores de riesgo del paciente con hvKP incluyen tener entre 55 y 60 años, ser hombre y tener diabetes mellitus (Shon *et. al*, 2013; Martin and Bachman, 2018).

I.2.- EPIDEMIOLOGÍA

A partir de la década de 1970, *K. pneumoniae* empieza a colonizar el ambiente hospitalario en los países occidentales desarrollados (Montgomerie J., 1979). Además, se identifica como la tercera causa principal infecciones adquiridas en el hospital (HAIs) en los Estados Unidos (9.9%) detrás de *Clostridium difficile* y *Staphylococcus aureus* colocándose entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en los hospitales (Horan *et. al*, 1988), y la tercera en causar neumonía que ocurre ≥48 h después del ingreso al hospital (Magill *et. al*, 2014). Las especies de *Klebsiella* son una de las principales causas de neumonía asociada al ventilador (VAP) entre pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI), así como del 83% de los casos adquiridos en el hospital (Selina *et. al*, 2014). En general las tasas de mortalidad por neumonía causada por *K. pneumoniae* se han reportado hasta del 50% (Podschun y Ullmann, 1998).

K. pneumoniae ahora se reconoce como el aislado más común tanto en Asia como en Estados Unidos y se observa en más del 60% de las infecciones (Kamal *et. al*, 2017). De las 145 infecciones nosocomiales epidémicas reportadas en la literatura inglesa entre 1983 y 1991, 13 fueron causadas por *Klebsiella*. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Atlanta, Georgia, sitúan la proporción de infecciones hospitalarias

endémicas causadas por *Klebsiella* en un 8% e indican que entre los brotes epidémicos causados por todos los patógenos, las cepas *Klebsiella* causan el 3% de estos brotes (Stamm *et. al*, 1981).

Klebsiella es el segundo microorganismo, después de *Escherichia coli*, causante de infecciones del torrente sanguíneo (BSI por sus siglas en inglés) ocasionadas por bacterias Gram negativas. La tasa de mortalidad es de aproximadamente 27,4 y 37% que se estima en la población en 1.3 por cada 100,000 personas (Podschun and Ullmann, 1998; Meatherall *et. al*, 2009; Magill *et. al*, 2014). *Klebsiella* también es responsable de infecciones de heridas/sitio quirúrgicas, este sitio representa aproximadamente 13% de todas las infecciones causadas por *Klebsiella* (Podschun y Ullmann, 1998; Magill *et. al*, 2014).

El tracto urinario es el sitio más común de infección por *K. pneumoniae* (Podschun y Ullmann, 1998) representando del 6 al 17%. Las infecciones urinarias asociadas a catéteres (CAUTI) causada por esta bacteria se ven facilitados por su capacidad de formar biopelículas y adherirse a los catéteres (Schroll *et. al*, 2010) también se ven afectados pacientes con diabetes mellitus o con vejigas neuropáticas (Vuotto *et. al*, 2014).

En la última década se han informado 813 casos de síndromes de abscesos hepáticos invasivos asociados con *K. pneumoniae* hipervirulenta, se ha demostrado una mayor incidencia de la enfermedad en hombres entre 55-60 años. (Patel *et. al*, 2014). Un trabajo de la CDC en el 2013 informó la frecuencia y la gravedad de las infecciones con estas cepas basadas en una encuesta del 2011 de 183 hospitales en los Estados Unidos. Por otro lado, las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) de *K. pneumoniae*, causaron un 23% de infecciones nosocomiales equivalentes a 17.000 infecciones y produjeron 1.100 muertes (CDC, 2013). Además estudios en Europa informaron que el 37,5% de *K. pneumoniae* fueron productores de BLEE (Basaranoglu *et. al*, 2017).

Mientras tanto las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas (KPC) causaron un 11% de infecciones nosocomiales equivalentes a 7.900 infecciones y produjeron 520 muertes (CDC, 2013). En Italia las tasas de mortalidad debidas a infecciones causadas por KPC son altas, van del 26% al 44%, alcanzando el 70% en casos de bacteriemia (Cristina *et. al*, 2016). Con la detección del gen *bla* KPC se reveló que la carbapenemasa más frecuente

era KPC-3 (83.8%) y que KPC-2 era menos común (16.2%) (Cristina *et. al*, 2016). En un hospital universitario en Grecia se informó que de las 73 infecciones por KPC entre el 2009 y 2011, 43.8% fueron identificadas en la unidad de cuidados intensivos (UCI), 41.1% en salas médicas y 15.1% en salas quirúrgicas (Poulou *et. al*, 2012).

1.3.- RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

K. pneumoniae es una de varias bacterias que ha experimentado un aumento dramático en la resistencia a múltiples antibióticos (MDR) en las últimas décadas, un proceso que probablemente provocará un aumento en el número de infecciones causadas por *K. pneumoniae* ya que esto presenta un problema significativo en el manejo y tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria. Los genes de resistencia se transportan en elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones; además de la aparición de mutaciones cromosómicas (Clegg and Murphy, 2016; Runcharoen *et. al*, 2017; Martin and Bachman, 2018). En *K. pneumoniae*, la resistencia a algunos betalactámicos es intrínseca ya que la enzima está codificada en el genoma central de la especie. Por ejemplo, SHV se encuentra constantemente en el cromosoma, y la resistencia a la ampicilina correspondiente es un sello distintivo de la especie (Babini y Livermore, 2000; Struve and Krogfelt, 2004).

Un mecanismo importante de resistencia es la pérdida o modificación de porinas, lo cual lleva a la disminución de la permeabilidad de la membrana externa bacteriana (Echeverri and Cataño, 2010). Pero entre estos mecanismos de resistencia se destaca la presencia de betalactamasas que confieren resistencia a diversos fármacos betalactámicos, las más comunes son TEM, SHV, CTX-M y OXA, siendo de gran importancia porque estos antibióticos son los más prescritos en todo el mundo (Peña *et. al*, 2001). También se sabe que *K. pneumoniae* alberga betalactamasas mediadas por plásmidos, como las enzimas AmpC que confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos penicilanícos (Jacoby, 2009; Vuotto *et. al*, 2014; Boyle and Zembower, 2015).

Sin embargo en la actualidad se han encontrado aislados de *K. pneumoniae* que expresan enzimas llamadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Runcharoen *et. al*, 2017). Estos mecanismos de resistencia codificados en plásmidos, se identificaron por primera vez en Europa en 1983 y en los Estados Unidos en 1989. Las BLEE pueden hidrolizar oximino-

cefalosporinas, como las cefalosporinas de tercera generación y el aztreonam, pero son inhibidos por el ácido clavulánico (Holt *et. al,* 2015; Martin and Bachman, 2018), también se han aislado cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE que mostraron una resistencia adicional al imipenem (Podschun and Ullmann, 1998).

Durante 2008 se informó en todo el mundo frecuencia alta de aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE: 9% en Europa y Estados Unidos, 25% en Asia, 45% en Sur América y en Colombia porcentajes de resistencia cercanos al 32% (Echeverri and Cataño, 2010). Por consiguiente debido a la presión selectiva del tratamiento de infecciones BLEE con carbapenems, surge la resistencia a estos antibióticos, la cual se describió inicialmente en los Estados Unidos en 1997 (Bradford *et. al,* 2004). El mecanismo más preocupante de la resistencia a carbapenems es a través de carbapenemasas mediadas por plásmidos. Las carbapenemasas *K. pneumoniae* (KPC) son serina carbapenemasas de clase A y son las carbapenemasas más frecuentemente encontradas (Mills *et. al,* 2016) que se han diseminado en todo el mundo y se ha informado que esta resistencia está presente en más del 33% de los aislados de centros médicos (Cristina *et. al,* 2016; Wu and Li, 2015; Martin and Bachman, 2018).

También han surgido tipos adicionales de carbapenemasas en el genoma accesorio de *K. pneumoniae*. La metalo-β-lactamasa-1 de Nueva Delhi (NDM-1) es una metalo-β-lactamasa (MBL) codificada por un plásmido (Nordmann *et. al,* 2011) descubierta en un aislado de cultivo clínico urinario de *K. pneumoniae,* asociada frecuentemente con viajes y hospitalización en regiones endémicas (Yong *et. al,* 2009). *K. pneumoniae* también porta las carbapenemasas metalo-β-lactamasas (VIM) codificadas por integron-Verona detectadas por primera vez en los Estados Unidos en 2010, las infecciones están asociadas con los viajes y la hospitalización, además se han encontrado aislamientos en Grecia e Italia. Las variantes de VIM (bla VIM) se transportan en integrones que pueden insertarse en el cromosoma o en plásmidos (Pournaras *et. al,* 2005). Las metalo-β-lactamasa (MBL) de tipo imipenemasa (IMP) son endémicas en Japón, pero se han detectado en todo el mundo, también se transportan en integrones y pueden ser codificadas en cromosomas o en plásmidos (Docquier *et. al,* 2003; Limbago *et. al,* 2011). Las carbapenemasas OXA son enzimas de clase D que se caracterizan por su capacidad para hidrolizar cloxacilina u oxacilina (Bush y Jacoby, 2010).

El plásmido codificado OXA-48 (bla OXA-48) se ha encontrado en *K. pneumoniae* y confiere un alto nivel de resistencia al imipenem (Poirel *et. al*, 2004; Voulgari *et al.* 2013; Granata and Petrosillo, 2017).

En consecuencia con la aparición de las carbapenemasas se ha obligado a regresar a la colistina como antibiótico de último recurso, pero también ha surgido *K. pneumoniae* resistente a la colistina. Desafortunadamente la prevalencia está aumentando a nivel mundial e infecciones debidas a *K. pneumoniae* resistente a colistina tienen una alta tasa de mortalidad (Capone *et. al,* 2013). En un estudio del 2013, 8.8% de los aislamientos de *K. pneumoniae* fueron resistentes a la colistina, y la mayoría de los aislamientos eran de Grecia, Italia, Rumania y Hungría (Granata and Petrosillo, 2017). La resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* generalmente ocurre a través de mutaciones en genes reguladores como *mgrB* que regulan la modificación del lípido bacteriano A, el objetivo de los antibióticos polimixinas, disminuyendo la capacidad de las polimixinas para interactuar, esta resistencia esta mediada por genes cromosómicos o plásmidos (Jayol *et. al*, 2015; Granata and Petrosillo, 2017).

Por otro lado en los Estados Unidos se ha informado recientemente una alta tasa de resistencia a la tigeciclina en *K. pneumoniae* en un estudio en 287 pacientes hospitalizados se encontró que el 46% de los casos con *K. pneumoniae* resistente a carbapenem también fueron tigeciclina intermedia o resistente (Van Duin *et*. *al*, 2015).

I.4.- FACTORES DE VIRULENCIA

K. pneumoniae emplea muchas estrategias para crecer y protegerse de la respuesta inmune del huésped. Es importante destacar que muchas cepas mutantes en genes que codifican factores de virulencia de *K. pneumoniae* son eliminadas de los pulmones de ratones más rápidamente que las cepas de *K. pneumoniae* tipo silvestre, lo que sugiere que esta última, emplea diversos factores de virulencia para evadir las respuesta inmune temprana del hospedero y causar infecciones graves. Estos factores de virulencia pueden estar codificados por genes tanto en los genomas centrales como accesorios. Un ejemplo muy estudiado es en locus *cps* de la capsula. (Cortes *et. al,* 2002; Martin and Bachman, 2018).

Hasta la fecha, existen cuatro clases principales de factores de virulencia que se han caracterizado bien en *K. pneumoniae*. Estos factores de virulencia consisten en cápsulas, incluyendo la producción de hipercápsulas hipermucoviscosa en cepas hipervirulentas (HV); lipopolisacárido (LPS); sideróforos; los pili de tipo 1 y tipo 3 implicados en la adherencia y en la capacidad de participar en biofilm (Patel *et. al,* 2014; Vuotto *et. al,* 2014; Paczosa and Mecsas, 2016) (Figura 2). Más recientemente también se han identificado como factores de virulencia la utilización de alantoína, otros sistemas de absorción de hierro, bombas de flujo de salida y un sistema de secreción tipo VI (Martin and Bachman, 2018).

I.4.1.- CÁPSULA

La capsula es una estructura que se encuentra en el exterior de la célula bacteriana unida a la membrana externa que protege a la bacteria de la fagocitosis y además evita la muerte por péptidos antimicrobianos (Vuotto *et. al,* 2014; Wu and Li, 2015; Clegg and Murphy, 2016; Doorduijn, *et. al*, 2016; Martin and Bachman, 2018). La cápsula de *K. pneumoniae* es una capa densa de aproximadamente 160 nm de estructuras fibrilares cuyas subunidades pueden clasificarse en 80 tipos serológicos denominados antígenos K (es decir, K1 y K2, hasta K80); esto se debe a que se compone de ácidos urónicos con carga negativa, de polisacáridos capsulares complejos dando origen a estructuras de alto peso molecular con unidades repetitivas lineales o ramificadas de dos a siete monosacáridos que pueden cambiar siendo esenciales para la virulencia de *Klebsiella* (Podschun and Ullmann, 1998; Echeverri and Cataño, 2010; Wu and Li, 2015; Clegg and Murphy, 2016).

Los avances recientes en técnicas moleculares han llevado a una mayor discriminación entre los antígenos capsulares durante las infecciones clínicas de *K. pneumoniae,* así como a la secuenciación completa del locus *cps* en todos los serotipos (Pan *et. al,* 2015; Clegg and Murphy, 2016; Martin and Bachman, 2018). Los tipos capsulares están relacionados con la gravedad de la infección (Pan *et. al.* 2013). Por ejemplo, las cepas K1 y K2 son generalmente más virulentas que las cepas de otros serotipos (Yu *et al.* 2008); esto también se observó en un modelo de peritonitis de ratón (Podschun and Ullmann, 1998). También otros estudios revelaron que el serotipo K2 parece ser un serotipo especialmente común entre los aislados clínicos de *K. pneumoniae,* pero raro entre los aislados ambientales (Struve and Krogfelt,

2004). Las infecciones recientemente descritas de *K. pneumoniae* que resultan en infecciones piógenas diseminadas son comúnmente causadas por serotipos K1 (Wu and Li, 2015). El serotipo K2 se asocia con mayor frecuencia con infecciones urinarias, pero representa solo el 13% de los aislamientos examinados, existiendo entonces un rango más amplio de serotipos implicados en este tipo de infecciones (Clegg and Murphy, 2016). En las lesiones cutáneas inducidas experimentalmente en ratones, las cepas de los serotipos K1, K2, K4 y K5 de *Klebsiella* son más virulentas que las que expresan otros tipos de cápsulas (Podschun and Ullmann, 1998).

Los genes necesarios para la producción de cápsulas en las cepas clásicas y *K. pneumoniae* hipervirulentas (hvKP) se encuentran en un operón cromosómico *cps* que alberga los genes *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *wca*, *cpsB*, *cpsG* y *galF*. Se cree que los genes *wzb* y *wzc* son esenciales para la síntesis de cápsulas en *Klebsiella* (Pan *et. al*, 2013). En general, la región *cps* de *K. pneumoniae* comienza en *galF* y termina en *ugd*, la presencia de *ugd* podría explicar la prevalencia de ácidos glucurónicos en las cápsulas. La longitud de los grupos de genes capsulares de *K. pneumoniae cps* varía de 21 a 30 kb (Shu *et. al*, 2009).

La regulación transcripcional del grupo de genes *cps* es importante para la síntesis de la cápsula y la patogenicidad de *K. pneumoniae*. Las proteínas RmpA2, RcsAB y RfaH modulan la expresión diferencial de los grupos de genes *cps* (Lai *et. al*, 2003; Shu *et. al*, 2009). La distribución de estos alelos varía entre los serotipos y la región geográfica de los aislados (Clegg and Murphy, 2016). Los genes que codifican para RmpA y MagA están altamente asociados con *K. pneumoniae* hipervirulentas (hvKP). HvKP tiene un fenotipo hipermucoviscoso caracterizado por una prueba positiva de "cadena" la cual consiste que al intentar seleccionar una colonia con un asa se produce una cadena de bacterias que se adhiere al medio de agar. Se ha determinado que este fenotipo es conferido por dos proteínas: RmpA, que regula la producción de cápsulas (Hsu *et. al*, 2011; Shon *et. al*, 2013), y MagA, que está asociada con el fenotipo hipermucoviscoso (Yu *et. al*, 2006; Clegg and Murphy, 2016). Los tipos de cápsula K1 y K2 también están altamente asociados con hvKP y pueden desempeñar un papel más importante en la virulencia que rmpA y magA (Shon *et. al*, 2013).

I.4.2.-PILIS TIPO 1 Y 3

Las propiedades adhesivas en las *Enterobacteriaceae* generalmente están mediadas por diferentes tipos de pili. Los aislados de *K. pneumoniae* producen dos tipos de pili bien caracterizados: Los pilis tipo 1 (∼1 μm de largo) y los pili tipo 3 (∼0.5−2 μm de largo) (también conocidas como fimbrias) son adhesinas fimbriales filamentosas no flagelares, frecuentemente detectadas en la superficie bacteriana que ayudan en la colonización inicial al unirse a la célula huésped (adherencia). Estas estructuras tienen hasta 10 μm de largo y tienen un diámetro de 1 a 11 nm consisten en subunidades poliméricas de proteína globular (pilina) con una masa molecular de 15 a 26 kDa. Sobre la base de su capacidad para aglutinar eritrocitos y dependiendo de si la reacción es inhibida por la D-manosa, estas adhesinas se designan como manosa-sensibles (MSHA) o hemaglutininas resistentes a la manosa (MRHA), respectivamente (Podschun and Ullmann, 1998; Echeverri and Cataño, 2010; Martin and Bachman, 2018).

Las fimbrias de tipo 1 (T1P) son sensibles a manosa, llamadas así por su capacidad de unirse a la manosa soluble como un inhibidor competitivo de la unión y están codificadas por un operón (*fim*) que contiene todos los genes necesarios para la estructura y el ensamblaje fimbrial. El gen *fimA* codifica la subunidad principal FimA, que constituye la subunidad estructural, mientras que las propiedades adhesivas están codificadas por la subunidad menor FimH en la punta. El pili tipo 1 se ensambla través de la vía chaperona-usher (Li *et. al,* 2014; Vuotto *et. al,* 2014; Alcántar *et. al,* 2015; Clegg and Murphy, 2016). Los genes de fimbria tipo 1 se expresan en el tracto urinario pero no en el tracto gastrointestinal o en los pulmones, sugiriendo el hecho de que *K. pneumoniae* por medio del pili tipo 1 contribuye en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario humano (ITU) (Struve *et al.* 2009; Li *et. al,* 2014; Alcántar *et. al*, 2015).

Las fimbrias de tipo 3 son resistentes a manosa, son filamentos similares a hélices y en *K. pneumoniae* estas fimbrias están codificadas por el grupo de genes *mrkABCD*. Su estructura consiste en la estructura principal del eje fimbrial MrkA, la adhesina fimbrial MrkD situada en la punta, además, MrkB, C, y E están implicados en el ensamblaje y la regulación de la expresión. MrkF participa en la estabilidad superficial de las fimbrias (Murphy and Clegg,

2012; Vuotto *et. al,* 2014; Clegg and Murphy, 2016; Paczosa and Mecsas, 2016). Estos genes se pueden encontrar en el cromosoma y en un plásmido, lo que sugiere que hay transferencia de genes entre especies de *Klebsiella* (Di Martino *et. al,* 1996). Se cree que son producidas por la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* para promover la adherencia a las células endoteliales, células epiteliales traqueales, células tubulares renales, las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, las membranas basales del tejido pulmonar y desempeñan un papel importante en la formación de biopelículas. (Podschun and Ullmann, 1998; Alcántar *et. al,* 2015; Clegg and Murphy, 2016; Wang, *et. al,* 2016).

Investigaciones más recientes han demostrado que ambos tipos de pili juegan un papel en la formación de biopelículas (Schroll *et. al,* 2010), y actúan como un factor en la colonización de los catéteres urinarios lo que lleva a infecciones urinarias (Murphy *et. al,* 2013).

Otras adhesinas menos estudiadas en *K. pneumoniae* son: una estructura fimbrial llamada KPF-28 y las fimbrias Kpc. La fimbria KPF-28 denominada así debido a que tiene una masa molecular de 28 kDa, es una fimbria larga, delgada y flexible que tiene un diámetro de 4–5 nm y una longitud de 0,5–2 mm. Se ha descrito en el 83% de los aislados franceses resistentes a múltiples fármacos y contribuyen a la adhesión de *K. pneumoniae* a las líneas celulares de Caco-2 humano, lo que indica que las fimbrias pueden ser un factor de colonización dentro del intestino de los mamíferos (Di Martino *et. al,* 1996; Alcántar *et. al,* 2015).

Las fimbrias Kpc son sintetizadas y ensambladas por los productos del operón *kpcABCD*, se asocian con mayor frecuencia con cepas positivas para K1 de *K. pneumoniae* que causan infecciones piógenas diseminadas, puede contribuir a la formación de biopelículas, además está altamente asociado con *K. pneumoniae* hipermucoviscoso (Wu *et. al,* 2010).

I.4.3.- LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

El LPS, también conocido como endotoxina, el cual es un componente estructural de la membrana celular de todas las bacterias Gram-negativas. El LPS es detectado a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4) por parte de las células del hospedero lo que conduce a una cascada inflamatoria (Martin and Bachman, 2018), protegiendo contra las defensas humorales, pero también es un fuerte activador inmune (Paczosa and Mecsas, 2016).

El LPS consta de tres partes: el lípido A altamente conservado e hidrófobo anclado en la membrana externa; el antígeno O altamente variable como el componente más externo del LPS; y un núcleo de oligosacárido que conecta el lípido A y el antígeno O. Estos componentes están codificados por grupos de genes *wb*, *waa* y *lpx*, respectivamente (Wu and Li, 2015). Las variaciones de las estructuras químicas en las cadenas O son la fuente de la antigenicidad O serológicamente distinta, sólo se han identificado 9 tipos diferentes de antígeno O en *K. pneumoniae* (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12) (Hansen *et. al*, 1999). Siendo los serogrupos O1, O2 y O3, responsables de casi el 80% de todas las infecciones de *Klebsiella* (Follador *et al.*, 2016) pero el serotipo O1 es el más prevalente entre los aislados clínicos (Hansen *et. al,* 1999; Doorduijn *et. al,* 2016) y también es el más frecuente en cepas hipermucoviscosas (invasivas) (Hsieh *et. al,* 2012).

Las cepas que contienen un antígeno O de longitud completa es "LPS liso" y son resistentes a la muerte mediada por el complemento, mientras que aquellas con cadenas O truncadas o ausentes es "LPS rugoso" y son sensibles a la muerte mediada por el complemento en el torrente sanguíneo, incluso en presencia de cápsula, por lo tanto se especula que la falta de antígeno O puede hacer a *K. pneumoniae* menos virulenta (Merino *et. al,* 1992). Además las variaciones en el LPS también pueden desempeñar un papel en la protección de las bacterias de los péptidos antimicrobianos, incluidos los antibióticos polimixina (Li *et. al,* 2014; Martin and Bachman, 2018).

I.4.4.- SIDERÓFOROS

El hierro es un factor esencial en el crecimiento bacteriano, por lo tanto es requerido por *K. pneumoniae* para que prospere durante la infección. Sin embargo el suministro de hierro libre disponible para las bacterias en el hospedero es extremadamente bajo, ya que se encuentra unido a proteínas intracelulares como la hemoglobina, ferritina, hemosiderina, mioglobina y a proteínas extracelulares como a la lactoferrina y la transferrina (Podschun and Ullmann, 1998; Paczosa and Mecsas, 2016). La táctica predominante utilizada por muchos patógenos, incluyendo *K. pneumoniae*, para adquirir hierro es a través de la secreción de quelantes de hierro de alta afinidad y de bajo peso molecular, llamados sideróforos, capaces de quelar de

manera competitiva el hierro unido a las proteínas del huésped (Podschun and Ullmann, 1998).

Los sistemas de sideróforos dependen con frecuencia de una familia de proteínas que incluye transportadores de cassetes de unión a ATP (ABC) TonB, una proteína que regula el transporte de hierro hacia la célula bacteriana. TonB está codificado por un gen en el cromosoma bacteriano y de hecho, el propio TonB se considera un factor de virulencia en *K. pneumoniae* (Hsieh *et. al*, 2008; Martin and Bachman, 2018).

Las enterobacterias sintetizan una variedad de sideróforos que pertenecen a dos grupos químicos diferentes, los sideróforos de tipo fenolato y los sideróforos de tipo hidroxamato. El grupo más común consiste en los sideróforos de tipo fenolato, el cual su representante más conocido es la enterobactina (también conocida como enterochelin), que es un trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoil-serina. Los sideróforos de tipo hidroxamato, los ferricromos, los más importantes son las ferrioxaminas y la aerobactina (Wooldridge *et. al*, 1993).

En *K. pneumoniae* se ha demostrado que expresa varios sideróforos incluyendo enterobactina, yersiniabactina, salmochelina y aerobactina (Williams *et. al*, 1987; Patel *et. al*, 2014; Paczosa and Mecsas, 2016). En un estudio de más de treinta cepas que representan 23 serotipos capsulares diferentes de *K. pneumoniae* implicados en infecciones del tracto urinario, el sideróforo enterobactina fue el compuesto más producido para la captación del hierro (Tarkkanen *et. al*, 1992), presente tanto en las cepas clásicas como hipervirulentas, por lo tanto se considera que es el sistema de captación de hierro primario utilizado por *K. pneumoniae*. Los genes que se requieren para la biosíntesis de enterobactina están en el cromosoma codificados en los genes *entABCDEF*, mientras que el grupo de genes *fepABCDG* codifica las proteínas que median su transporte (Clegg and Murphy, 2016).

La yersiniabactina (Ybt) se identificó por primera vez en especies de *Yersinia*, los genes que codifican la biosíntesis, el transporte y la regulación de esta molécula se encuentran en una isla de patogenicidad (Martin and Bachman, 2018), y se ha observado en sólo el 18% de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* clásicos, pero en 90% en cepas HV, expresándose durante la infección pulmonar (Holt *et. al*, 2015).

Salmochelina (Sal) es utilizado por *K. pneumoniae* para para evadir el sistema inmune innato, está presente en *K. pneumoniae* nosocomial alrededor del 2 a 4% pero es mucho más prevalente en cepas de *K. pneumoniae* HV con un 90% asociado con absceso hepático piógeno (Paczosa and Mecsas, 2016).

La aerobactina (Aer) es un sideróforo citrato-hidroxamato típicamente codificado por plásmidos, tiene ventajas físicas como mayor estabilidad y mejor solubilidad, además se puede reciclar después de cada turno de transporte de hierro (Podschun and Ullmann, 1998); raramente se expresa en los aislados clínicos de *K. pneumoniae* nosocomial, ya que se encuentra en solo alrededor del 6% de cepas clásicas, aunque está presente en 93 a 100% en cepas HV *K. pneumoniae* (Li *et al*. 2014; Paczosa and Mecsas, 2016).

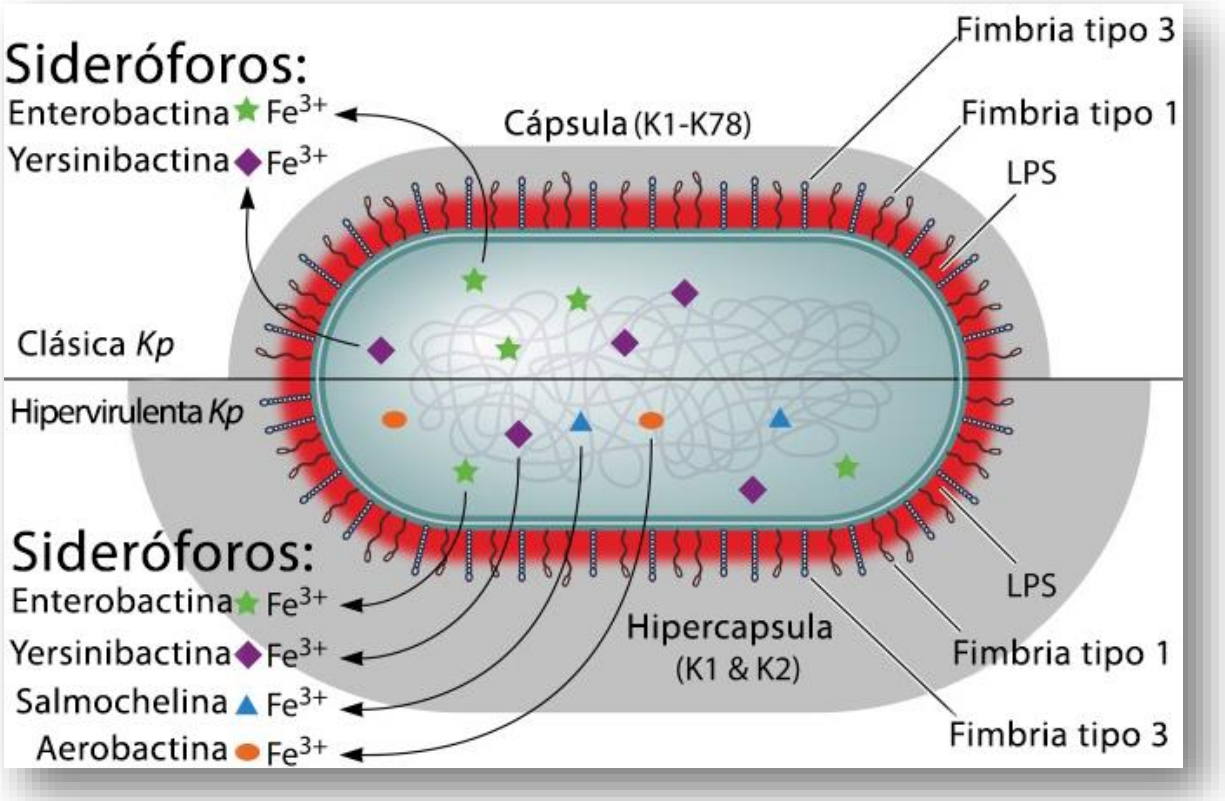


Figura 2. Cuatro factores de virulencia bien caracterizados en cepas de *K. pneumoniae* clásicas e hipervirulentas (hvKP) (Fuente Paczosa and Mecsas, 2016).

I.5 PILI TIPO IV (PT4)

La mayoría de las bacterias están decoradas con apéndices filamentosos en su superficie, como flagelos, pili, sistemas de secreción y fimbrias (Bergeron and Sgourakis, 2015). Los pili (latín para "pelo") son apéndices superficiales filamentosos que muestran muchas bacterias patógenas y ambientales. Una clase bien estudiada es el pili tipo IV (González and Forest, 2017). El término pili tipo IV (PT4) fue acuñado originalmente por Ottow en 1975 (Ottow, 1975), estas estructuras son filamentos finos (6-8 nm de ancho), más delgados que los flagelos con longitudes que podrían alcanzar hasta 10 μm. Son fibras flexibles que se agregan lateralmente para formar haces característicos. Se expresan en algunas especies en los polos celulares por ejemplo, en *Myxococcus xanthus* o *Pseudomonas aeruginosa*) y en otras peritricamente por ejemplo, en *Neisseria gonorrhoeae o Deinococcus geothermalis* (González and Forest, 2017) (Figura 3).

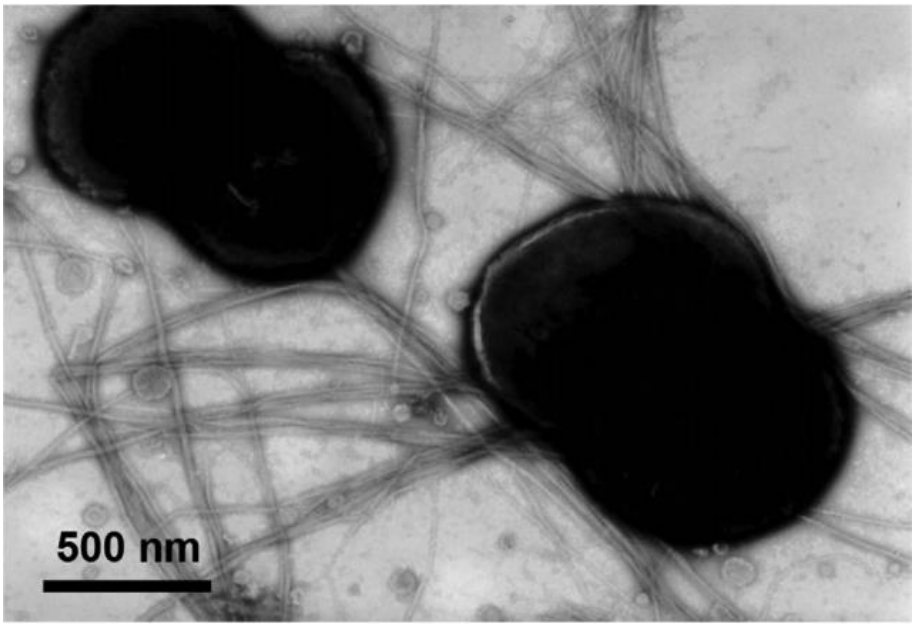


Figura 3. Pili tipo IV en *Neisseria meningitidis* (Fuente: Muschiol *et. al,* 2015).

El PT4 se encuentra en diversas especies Gram negativas, los más estudiados son en *Neisseria gonorrhoeae, N. meningitidis, Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*; y Gram positivas, tales como *Clostridium perfringens* y *Ruminococcus, Staphylococcus, Streptococcus* y especies de *Bacillus* (Craig *et. al*, 2019). Curiosamente, está evolutivamente relacionado con otros apéndices como el sistema de secreción Tipo II (T2SS), cuya función es promover la secreción de proteínas (como toxinas) en el ambiente extracelular en algunas bacterias Gram negativas y el archellum de arqueas, que permite la motilidad, lo que sugiere que tienen un origen común y son variaciones de un sistema de transporte macromolecular (Bergeron and Sgourakis, 2015).

La estructura principal, también conocida como la "varilla fimbrial" o "eje pilus", está compuesta de varios cientos (probablemente miles) homopolímeros de una única subunidad llamada pilina de 15-20 kDa, así como algunas copias de varias pilinas menores diferentes y en algunos pili poseen una subunidad adhesiva en la punta. Un conjunto básico de 12-15 proteínas sirven como componentes del pili o están directamente implicados en el ensamblaje y la función (Craig *et. al*, 2006; Jarrell and McBride, 2008; Bergeron and Sgourakis, 2015).

El PT4 está involucrado en diversas funciones bacterianas como organelos adhesivos a la célula huésped, formación de microcolonias, desarrollo de biopelículas, transferencia de electrones, comunicación célula-célula, incluyendo la captación de ADN durante la transformación, la transducción de fagos y una forma de movimiento independiente de flagelos conocida como motilidad espasmódica (*twitching*) (Wall & Kaiser, 1999; Craig *et, al.* 2006; Hansen and Forest, 2006; Proft and Baker, 2009; Chang *et. al*, 2016; González and Forest, 2017).

La mayoría de los microorganismos móviles utilizan sistemas sensoriales complejos para controlar sus movimientos en respuesta a los estímulos, lo que les permite migrar a entornos óptimos que pueden ser mediados por flagelos o pili tipo IV (PT4) (Proft and Baker, 2009). Hace más de 25 años fue propuesto un mecanismo basado en observaciones de la unión de bacteriófagos al pili durante la infección de células. Este mecanismo consiste en la extensión del pili, la unión a una superficie y la retracción, este tipo de movimiento se denomina motilidad *twitching*, ya que en muchos casos resulta en movimiento espasmódico. Las células se mueven a velocidades de 0,05-1 μm por segundo y la proximidad cercana a otra célula

suele ser necesaria para un movimiento eficiente. En otras bacterias, la retracción del pili produce un movimiento suave que históricamente se ha denominado motilidad deslizante (*gliding*), pero en todos los casos el mecanismo de propulsión es similar (Wall and Kaiser, 1999; Jarrell and McBride, 2008).

Veinte años más tarde, la prueba definitiva de que la retracción de PT4 resulta en el movimiento celular fue obtenido por experimentos independientes por observaciones microscópicas y análisis moleculares en la última década con proteobacterias como *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Myxococcus xanthus*. (Ottow, 1975). Los PT4 también se han descrito en otras bacterias como cianobacterias unicelulares y filamentosas, tales como *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Nostoc punctiforme* (Craig *et. al*, 2006; Jarrell and McBride, 2008; Proft and Baker, 2009).

Una característica de las pilinas (subunidades del PT4) es que se sintetizan como precursores o proteínas inmaduras llamadas prepilinas las cuales poseen un péptido líder hidrófilico que termina con una glicina que es escindida por una peptidasa líder única. Por lo tanto, el PT4 puede clasificarse en dos grupos basado en la longitud del péptido líder (prepilina) y la longitud de la proteína madura. Las pilinas de tipo T4a poseen péptidos líderes cortos de menos de 10 residuos para formar una proteína madura de 150 - 160 residuos, mientras que las pilinas de tipo T4b tienen péptidos líderes largos de 15 a 30 residuos para formar una proteína madura corta de 40 - 50 residuos o muy larga de 180 - 200 residuos.). Las de T4a a menudo tienen una Fenilalanina metilada en el extremo N- terminal después de la eliminación de la secuencia de señal, mientras que las pilinas de T4b pueden tener otros residuos, típicamente hidrofóbicos, en la misma posición (Hansen and Forest, 2006; Giltner *et. al*, 2012; Chang *et. al*, 2016). A nivel del genoma, los genes para las subunidades T4a y la maquinaria de ensamblaje se encuentran en múltiples operones dispersos alrededor del cromosoma, mientras que los de T4b se agrupan en una sola región genómica u operon (González and Forest, 2017).

Las pilinas T4a son una clase relativamente homogénea y se encuentran en patógenos de plantas, animales y humanos como *Pseudomonas*, *Neisseria* y *Dichelobacter*, así como en géneros ambientales como *Thermus*, *Myxococcus*, *Deinococcus*, *Bdellovibrio* y *Shewanella*. La clase T4b es más diversa y se caracteriza mejor por bacterias entéricas como *Escherichia*

coli enteropatógena, enterohemorrágica y enterotoxigénica, *Salmonella* enterica serovar Typhi y *Vibrio cholerae*. Las pilinas T4b se dividen aún más en subtipos, incluidos los pili de adherencia estricta (Tad; también llamados Flp o Fap) que se identificaron por primera vez en los *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y en *Micrococcus luteus*. Los Tad pili se distribuyen entre una variedad de especies Gram-positivas y Gram-negativas, incluidas bacterias ambientales bien estudiadas como *Caulobacter*. Los Tad pili tienen subunidades más pequeñas (~7 a 8 kDa) que otros sistemas PT4 y T2SS (~15 a 20 kDa). Pero recientemente Ellison y colaboradores (Ellison *et. al*, 2017) propusieron otorgarles una categoría separada, pili tipo T4c. Otros subtipos de Tab incluyen el longus pili codificado por un plásmido de *E. coli enterotoxigénica*, llamado así porque pueden alcanzar longitudes de 20 μm o más (Giltner *et. al*, 2012; Piepenbrink, 2019).

El pili tipo IV se extiende y retrae a velocidades de aproximadamente 1,000 subunidades por segundo lo que requiere una maquinaria compleja de proteínas que abarca ambas membranas en el caso de bacterias Gram negativas (Craig *et. al*, 2019). La biogénesis del PT4 implica un número grande de proteínas (12 o más) que se conservan entre especies bacterianas divergentes. Varias de estas son proteínas básicas que se requieren en todos los sistemas del PT4 e incluyen: a) la subunidad de la pilina principal; b) una prepilina peptidasa de membrana interna específica, que escinde el péptido señal N - terminal; c) una ATPasa específica que potencia el montaje del pilus; d) una proteína integral de la membrana interna que recluta la ATPasa del citoplasma; y e) una secretina de membrana externa integral que es necesaria para la salida del PT4 a la superficie bacteriana Además, se encuentra una "ATPasa de retracción" que es responsable de la despolimerización de la fibra del pili en todos los pili de Tipo T4a (Pelicic, 2008; Proft and Baker, 2008; Melville and Craig, 2013; Craig *et. al*, 2019) (Figura 4).

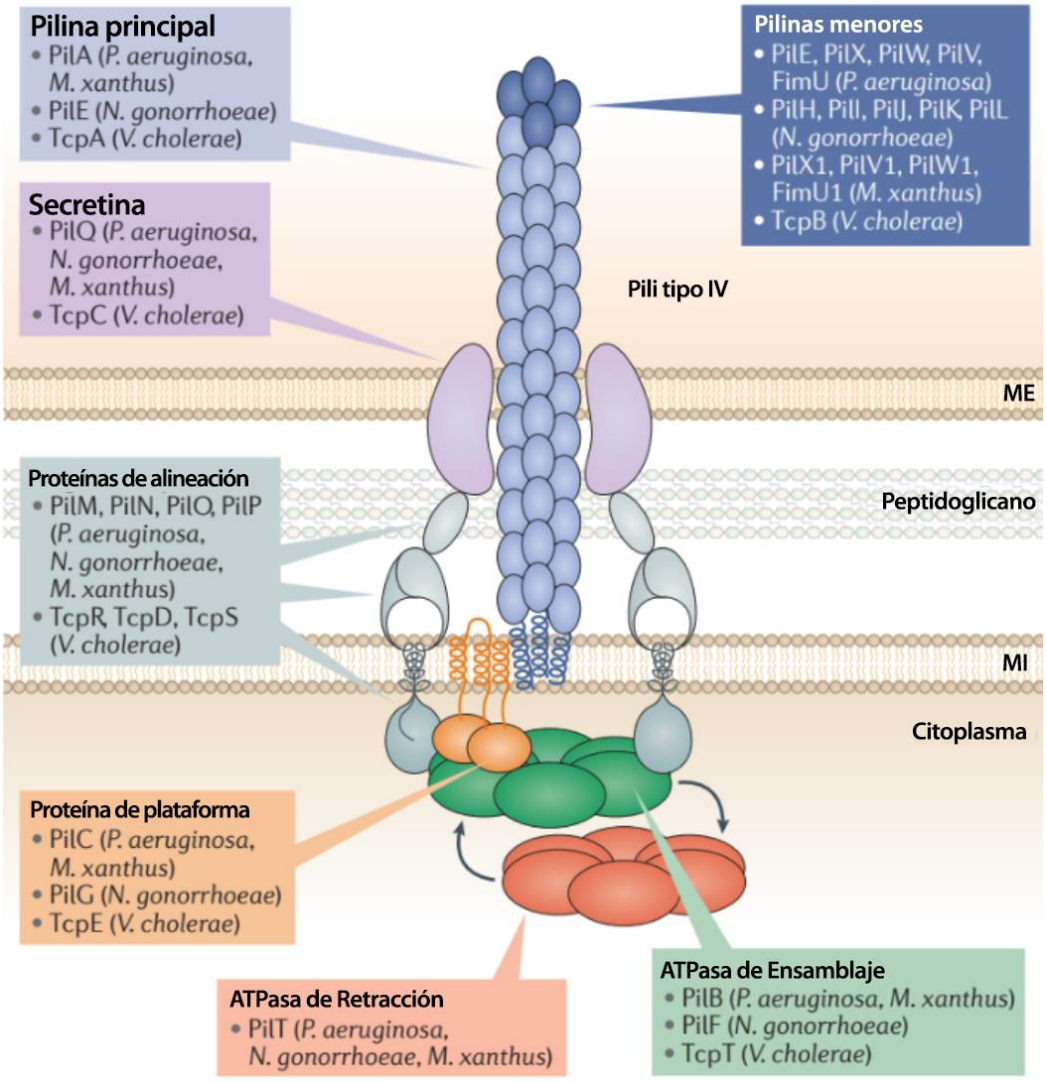


Figura 4. Proteínas necesarias para el ensamblaje del pili tipo IV (Fuente: Craig *et. al*, 2019).

1.5.1.-PILINA principal

La fibra del pili se compone principalmente de varias subunidades de la pilina, describiremos el sistema en *P. aeuroginosa* donde dicha subunidad es nombrada proteína PilA. PilA tiene un péptido señal inusual que es escindido por la prepilina peptidasa PilD, una enzima que es homóloga a la preflagelina peptidasa FlaK / PibD en el procesamiento de flagelina en arqueas. Las prepilinas se insertan en la membrana citoplasmática por el sistema Sec (Giltner *et. al*, 2012). La región N-terminal de la proteína de pilina procesada forma una α-hélice hidrofóbica larga de aproximadamente 53 residuos, mientras que la región C-terminal de carácter hidrofilico se pliega para formar hojas-β, formando un dominio globular (Jarrell and

McBride, 2008). La hélice N-terminal más conservada está incrustada en la membrana interna y promueve el ensamblaje del pili formando el núcleo hidrofóbico del filamento en crecimiento. El dominio globular de las proteínas de pilina se encuentra en el exterior del pili y varía en secuencia, tamaño y pliegue entre especies y / o tipo de pili (Hartung *et. al*, 2011).En su extremo C-terminal, una región hipervariable llamada región D desempeña un papel esencial en la adherencia de superficie para muchos pili. A pesar de la variación de secuencia de esta región D, posee consistentemente un enlace disulfuro (Bergeron and Sgourakis, 2015).

El ensamblaje de múltiples monómeros PilA da como resultado el empaquetado conjunto de las hélices hidrófobas, que están rodeadas por las regiones de la lámina β. La fibra de pili es helicoidal, con aproximadamente cinco monómeros de pilina por vuelta (Figura 5). Se cree que las ATPasas hexaméricas específicas del sistema sufrirán cambios conformacionales tras la hidrólisis de ATP, convirtiendo la energía química en energía mecánica, es decir se cree que la fuerza en las ATPasas potencia la extensión del pili, adición de subunidades de pilina a la base (polimerización) y / o retracción (eliminación de subunidades de pilina de la base, (despolimerización) (Giltner *et. al,* 2012). Al menos dos ATPases con actividades competitivas están involucrados en estos procesos. PilB se requiere para la extensión del pili, mientras que por estudios recientes de cristalografía de rayos X sugieren que la unión de ATP a la proteína PilT está implicada en la retracción (Wall & Kaiser, 1999; Chang *et. al*, 2016). Se ha propuesto que la hidrólisis de ATP por PilB o PilT da lugar a movimientos de tipo pistón de una proteína de membrana (posiblemente PilC) para añadir o eliminar monómeros de pilina durante el montaje y desmontaje, respectivamente. Finalmente, la estructura de pili ensamblada tiene que pasar a través de la membrana externa, lo que se consigue mediante la secretina de membrana externa (PilQ) un miembro de la superfamilia de secretina que también se utiliza en sistemas de secreción de Tipo II y en la liberación de fagos filamentosos. PilQ tiene una estructura parecida a una jaula con simetría cuádruple, consistente con un dodecánmero que comprende un tetrámero de trímeros PilQ. El complejo PilQ es un canal cerrado que requiere un cambio conformacional sustancial para permitir el paso de un filamento del pili intacto. (Jarrell and McBride, 2008; Pelicic, 2008; Proft and Baker, 2009). La capacidad de la célula para reciclar a PilA se ha demostrado por microscopía inmunoeléctronica y un análisis de la relocalización de la pilina que se marcó con biotina en

la superficie celular sugiere que las proteínas de pilina desarmadas se "funden" en la membrana citoplasmática, donde forman un conjunto de monómeros para el montaje del siguiente pili. La estructura de PilA encaja bien con esta idea, ya que es fácil imaginar cómo la hélice hidrófoba larga podría agregarse con sus vecinos para formar el núcleo del pili y permitir que los monómeros individuales se fundan en la membrana citoplasmática durante la retracción del pili. (Jarrell and McBride, 2008).

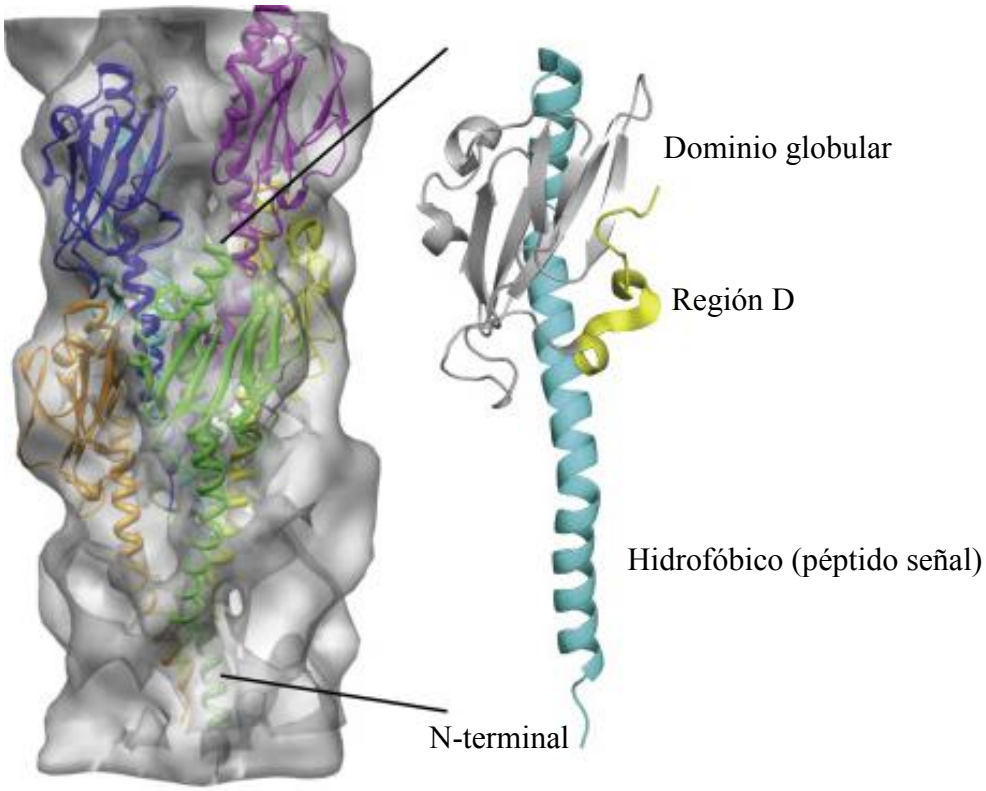


Figura 5. Prototipo del PT4 en *Neisseria gonorrhoeae* PilE con las estructuras cristalinas de la proteína pilina, se observan ambas regiones, en el extremo N-terminal se forma una α-hélice hidrofóbica larga, donde se localiza el péptido señal (azul), mientras que en la región C-terminal se pliega para formar hojas-β, formando un dominio globular (gris). Además se observa la región D (amarillo) (Fuente: Bergeron and Sgourakis, 2015).

I.6.- MUTACIÓN POR LAMBDA RED

La disponibilidad de un número creciente de genomas secuenciados ha generado la necesidad de desarrollar métodos eficientes que permitan el análisis funcional de genes recientemente identificados. La construcción de mutantes knockout por reemplazo de genes ha sido tradicionalmente un proceso lento porque requiere varios pasos de subclonación (Lesic and Rahme, 2008; Yamamoto *et. al*, 2009).

A finales del siglo pasado se desarrolló un método de mutagénesis, la cual es una estrategia poderosa y efectiva para generar una inserción, deleción o mutaciones puntuales precisas en *E. coli* (Murphy, 1998). El procedimiento implica la deleción de genes cromosómicos mediante recombinación homóloga entre la región cromosómica de interés y un producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste de un cassete de antibiótico flanqueado por brazos homólogos de aproximadamente 40 o más pares de bases del ADN blanco (Yang, *et. al*, 2014). En *E. coli*, se obtiene un ADN lineal en una PCR de 1 paso usando los cebadores que contienen una región que es homóloga con una región de 36 nucleótidos (nt) del gen diana y con parte del gen del antibiótico (Datsenko and Wanner. 2000; Yu *et. al*, 2000). Se logra una recombinación eficiente entre el producto de PCR y el cromosoma mediante la inducción del operón del fago lambda red (λ red). Los genes de lambda red se sintetizan bajo el control del promotor P_{BAD} (P_{araB}) regulado por la expresión inducida por L-arabinosa del activador transcripcional AraC (Guzmán *et. al*, 1995). Estos genes están codificados en un plásmido de bajo número de copias (Murphy, 1998). Dicho plásmido muestra replicación sensible a la temperatura para que sea fácilmente curado en las mutantes resultantes (Hashimoto-Gotoh *et. al*, 1981). Después de la selección, el gen de resistencia también puede eliminarse usando un plásmido auxiliar que expresa la recombinasa FLP, que actúa en los sitios FRT (objetivo de reconocimiento de FLP) repetidos directamente que flanquean el gen de resistencia. Los plásmidos que expresan este sistema lambda red, bajo el control de un promotor bien regulado para evitar eventos recombinacionales no deseados en condiciones no inductoras, son pKD20 y pKD46 (Datsenko and Wanner, 2000) (Figura 6).

El sistema lambda red incluye tres genes: α, β y γ, cuyos productos se denominan Exo, Bet y Gam, respectivamente (Murphy, 1998). Redγ (gam) inhibe la exonucleasa RecBCD del

huésped (Murphy, 1991), si bien RecBCD es una de las enzimas clave en el sistema de recombinación principal de *E. coli*, su activación depende de la presencia de sitios Chi (5'GCTGGTGG3 '), que están ausentes en el ADN lambda de tipo silvestre, por lo tanto, el papel de Redγ (Gam) es evitar la digestión promovida por RecBCD del ADN del fago λ, de modo que Redα Exo y Redβ Bet puedan obtener acceso a los extremos del ADN para promover la recombinación homóloga (Murphy, 1998). Debido a que Exo es una exonucleasa 5' -3' que actúa sobre el ADN de doble cadena (Carter and Radding, 1971), Bet es una proteína de unión al ADN monocatenario capaz de alinear cadenas complementarias de ssDNA (Shulman *et. al,* 1970; (Muniyappa and Radding, 1986; Datsenko and Wanner, 2000; Lesic and Rahme, 2008; Wei *et. al,* 2012) (Figura 6).

Este método de mutagénesis puede usarse de manera eficiente, rápida y no requiere de un paso de clonación previo. Se ha demostrado que promueve una tasa de recombinación mucho mayor, además pueden servir para eliminar regiones cromosómicas grandes aunque esto depende del organismo donde se lleve a cabo (Datsenko and Wanner B. 2000). Este sistema se ha modificado desde entonces como herramientas de recombinación adecuadas para otros microrganismo, incluidas diversas bacterias, hongos y bacteriófagos. La metodología se describió por primera vez en *Escherichia coli* y *Aspergillus nidulans*; y posteriormente se aplicó con éxito a *Shigella*, *Serratia*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae, Salmonella enterica, Streptomyces coelicolor*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pseudotuberculosis* (Lesic *et. al,* 2008; Wei *et. al,* 2012). También se ha aplicado con éxito en *K. pneumoniae* para la deleción del operón de síntesis de polisacáridos capsulares (Huang *et. al,* 2014), en la deleción de los genes *poxB, pta* y *ackA*, involucrados en las dos vías principales de síntesis del acetato (Lin *et. al*, 2016), en la mutación en el gen de virulencia VF2 en la cepa KG1 de *K. pneumoniae* que no se vio afectado el crecimiento celular y la producción de 1,3-propanodiol (Gao *et. al*, 2014) y en la deleción del gen *dhak1* que codifica una subunidad de la enzima dihidroxiacetona quinasa II que también está en relación con *K. pneumoniae* como un importante microorganismo industrial (Wei *et. al*, 2012).

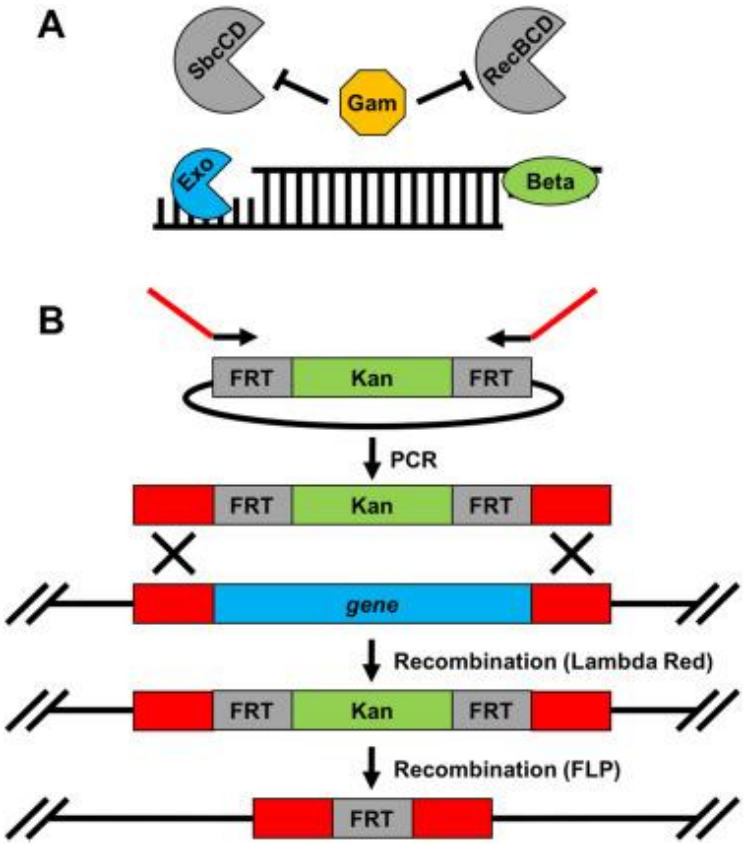


Figura. 6. Sistema de recombinación lambda red, se observan la función de las proteínas Exo, Beta y Gam, además como ocurre el sistema de recombinación y la eliminación del cassete de resistencia a kanamicina por el sistema recombinación FLP (Fuente: Kamil *et. al*, 2018).

II.-ANTECEDENTES

En trabajos previos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) se obtuvieron e identificaron por pruebas bioquímicas cepas de *Klebsiella pneumoniae* a partir de muestras de sangre de pacientes con sepsis neonatal provenientes de tres hospitales y a las cuales se les determino su perfil de resistencia a antibióticos (Díaz, 2008).

Diez de las cepas presentaron movilidad en medio MIO, por lo cual se trabajaron en concentraciones de agar: 0.17, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8 y 1.5%, diferentes temperaturas: 25, 30, 37, y 42°C y teniendo mayor movilidad en placas de TSA con 0.25% de agar a 37°C y 24 horas de incubación, en tubo 0.17 y 0.2%. En estos ensayos de movilidad se presentaron halos de 3-3.5 cm y debido a que este fenotipo se presenta en medios con bajas concentraciones de agar se considera como movilidad tipo *swarming*. Esta movilidad es producida por la acción motora del flagelo por lo cual se diseñaron oligonucleótidos para tratar de identificar el gen de flagelina *fliC.* Esto se realizó en base a las secuencias reportadas en GenBank para el gen *fliC* de *E. coli* K12, *Shigella flexneri* y *Salmonella entérica*. Se observó un amplificado de 1400 pb en las cepas *K. pneumoniae* 003, 021 y 024 que corresponde al tamaño esperado.

Debido a que *K. pneumoniae* es conocida por ser inmóvil se realizó la identificación genotípica de cuatro de las diez cepas móviles a través de los genes *rpoB* y la subunidad *16s* de rRNA para confirmar su identidad. Los resultados mostraron que la cepa 003 tiene un 98% de similitud con *Klebsiella pneumoniae* usando el gen *16s* de rRNA y 99% de similitud con *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* usando el gen *rpoB*. Estos resultados confirman que la cepa reportada previamente pertenece al género y especie *Klebsiella pneumoniae* (Carabarin *et. al*, 2016).

Además se realizó la identificación del flagelo en las cepas 021 y 003 mediante Microscopia Electrónica de transmisión (TEM) y el uso de la tinción Ryu la cual es específica para dicho apéndice. Estos resultados en conjunto demostraron la presencia de un flagelo polar en *Klebsiella pneumoniae* de una longitud de 10 μm y un ancho de 23 nm para la cepa 021 (León 2012, Carabarin *et. al*, 2016).

Por otro lado, en la microscopia electrónica de las cepas 003 y 021 se observó una estructura filamentosa que se asemeja a un PT4. Esta observación fundamentó la identificación de este pili ya que no ha sido reportado en *Klebsiella pneumoniae.* Analizando genomas de *K. pneumoniae* en el GenBank se encontró un gen "putative major pilin subunit" de *K. pneumoniae* (código: YP_005225129.1) el cual se sometió al programa Pilfinder, que identifica regiones específicas de corte para una prepilin peptidasa en una secuencia aminoácida. PilFinder mostró que la secuencia introducida corresponde a una pilina de tipo

IV. Posteriormente basándose en una secuencia se diseñaron oligonucleótidos para identificar el gen de la pilina en el cepario de *Klebsiella pneumoniae* donde se amplificó positivamente en las cepas 003 y 021. También se realizaron ensayos de autoagregación encontrando que las cepas 003, 021 y 024 tienen dicho fenotipo. Estos resultados sugieren que las cepas probadas podrían presentar un pili tipo IV putativo. Por otro lado el gen *pilA* fue clonado y está en proceso de purificación para la obtención de anticuerpos policlonales contra la pilina de *K. pneumoniae*.

II.1.- ANTECEDENTES DIRECTOS

López Reynoso (Tesis de Maestría López, 2019) en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, amplificó el gen para la pilina *(pilA)* en 26 aislados de *K. pneumoniae.* Por otro lado, el producto de 440 pb aproximadamente (*pilA*) de la cepa 003 se purifico y se mandó a secuenciar. Cuando el amplicón fue analizado con el programa BLAST, y se obtuvo el alineamiento con diferentes secuencias de *Klebsiella pneumoniae*, todas coincidían con productos denominados "pilina dependiente de prepilin peptidasa", también la secuencia obtenida tiene una identidad del 99% con las reportadas en GenBank.

Seguido de eso, la secuencia nucleotídica de la pilina se tradujo utilizando la herramienta ExPASy, donde la probable secuencia de aminoácidos consta de 143 aminoácidos. Posteriormente ésta secuencia de la pilina fue analizada con la herramienta PiliFind para identificar los motivos del péptido señal y el sitio de corte de la prepilin peptidasa que son necesarios para una pilina de tipo IV. El algoritmo de Pilifind mostró que la secuencia contiene el motivo transmembrana "GFTLIELMVVIGIIAILSAI". Dentro de ese motivo se observó el sitio GF (Glicina- Fenilalanina) que es requerido por la prepilin peptidasa para escindir el péptido señal. Con la información que se obtuvo sobre la pilina: un péptido señal corto de 6 aminoácidos, un tamaño de 143 aminoácidos y fenilalanina como primer aminoácido de la pilina madura, oriento a que la pilina de *K. pneumoniae* podría tratarse de una pilina tipo IV de clase "a" y no de clase "b" (Figura 7).

Al alinear la secuencia de aminoácidos de la pilina de la cepa 003 con secuencias de pilinas tipo IV de clase “a” de *P. aeruginosa*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* se observaron diversas similitudes como péptido señal corto, el sitio de corte “GF” las tirosinas 24 y 27 que están altamente conservadas en las pilinas tipo IV de clase “a” (Figura 7) Estás similitudes indican que PilA de *K. pneumoniae* es una pilina de tipo IV de clase “a”.

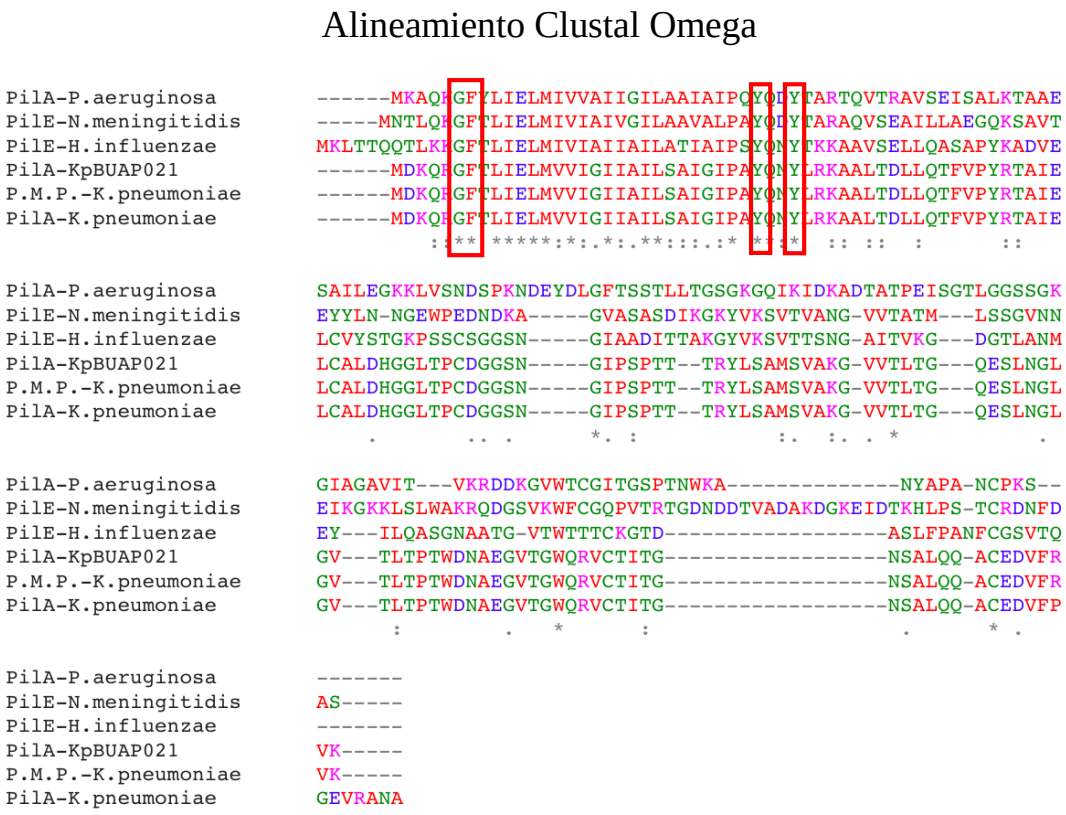


Figura 7. Alineamiento de la secuencia de PilA de *K. pneumoniae* cepa 003. El alineamiento se realizó con la secuencia de las pilinas mayores de *P. aeruginosa*, *N, meningitidis*, *H. influenzae* y dos secuencias de una pilina tipo IV putativa de *K. pneumoniae* reportadas en GenBank. Se observa el sitio sitio GF (Glicina- Fenilalanina) que es requerido por la prepilin peptidasa para escindir el péptido señal además las tirosinas 24 y 27 que están altamente conservadas en las pilinas tipo IV de clase “a” (recuadro rojo) (Tesis de Maestría López, 2019).

Además, se estandarizó la técnica para estudiar la movilidad tipo *twitching* para las 26 cepas de *K. pneumoniae*, usando picadura superficial en medio BHI en 2% de agar, a una

temperatura de 37°C y a un tiempo de 96 h. Sin embargo de todas las 28 cepas encontró que una de las cepas con mayor movilidad es la 003. También realizó la cuantificación de la expresión del gen *pilA* por PCR cuantitativa de las cepas 021 y 003 a partir de los ensayos de movilidad con fenotipo *twitching* donde observando una máxima expresión de *pilA* a las 48 y 72 horas respectivamente (Tesis de Maestría López, 2019).

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Klebsiella pneumoniae es uno de los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales causando infecciones como neumonía, sepsis, infecciones tracto urinario, abscesos hepáticos piogénicos, meningitis, conjuntivitis, endoftalmitis y fascitis necrotizante, entre otras. Afecta a diversos hospederos como personas inmunocomprometidas, neonatos, ancianos e incluso personas sanas. Además, se ha reportado la aparición de cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* en diversas partes del mundo que presentan un fenotipo de mayor virulencia, el hipermucoide, con la capacidad de evadir fácilmente la respuesta inmune del hospedero. Incluso es uno de los patógenos más resistente a múltiples fármacos por la adquisición de genes de resistencia por el uso indiscriminado de antibióticos, se han observado cepas multirresistentes limitando las opciones de tratamiento, conllevando a mayores gastos médicos y muerte.

Para que *K. pneumoniae* pueda causar todas estas infecciones nosocomiales tiene diversos factores de virulencia, pero aún falta investigar e identificar otros factores para entender mejor su patogenicidad y encontrar nuevas alternativas para controlar esta bacteria. Por lo cual es importante estudiar si el pili tipo IV juega un papel en su patogenicidad, para lo cual es indispensable primero caracterizarlo.

IV.-JUSTIFICACIÓN

K. pneumoniae es ubicua y tiene un amplio rango de hospederos. Pero hoy en día está particularmente asociada a infecciones adquiridas en el hospital como neumonía, septicemia, y las cepas hipervirulentas que infectan a personas sanas, están emergiendo. La mayoría de

las infecciones de *Klebsiella* se observan en casi cualquier sitio del cuerpo, aunque predominan las infecciones de tractos urinario y respiratorio.

Estas infecciones son difíciles de tratar debido a su eficiencia de colonización así como al uso indiscriminado de antibióticos que han originado un aumento considerable de cepas multirresistentes. Por lo tanto, las infecciones nosocomiales de *Klebsiella* siguen siendo una pesada carga para la economía y hay poca esperanza de vida de los pacientes en los países desarrollados. Aunque se han logrado progresos en la comprensión de los factores de virulencia que impulsan este síndrome clínico, todavía se necesitan pruebas diagnósticas rápidas y una mayor comprensión de estos factores para el control de la infección.
Es por esto que es de suma importancia realizar la mutación del pili tipo IV, ya que este no ha sido caracterizado en *K. pneumoniae,* para conocer en un futuro el papel que desempeña en la fisiopatología y poder utilizarlo como blanco terapéutico o como posible vacuna.

V.- OBJETIVO GENERAL

Generar la mutante de *Klebsiella pneumoniae* en el gen *pilA* del pili tipo IV.

V.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Adecuar la herramienta de mutagenesis lambda red (plásmido pKD46).

2.-Probar la funcionalidad de la herramienta generando la mutación del gen *pilA* de *Klebsiella pneumoniae.*

VI.- HIPÓTESIS

La herramienta de mutagenesis modificada (pKD46ΩTc^{R}) es capaz de generar la mutación en el gen *pilA* de *K. pneumoniae.*

VII.- MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1.-Tabla 1. Material Biológico:

Cepa/Vector	Características	Referencia
***Klebsiella pneumoniae* cepa 003**	Cepa aislada de sepsis neonatal del Hospital del Niño Poblano Puebla, CDMX.	Tesis de Licenciatura: Díaz, 2008, León 2009, Olivar, 2010 Tesis de Maestría León, 2012 Carabarin *et. al,* 2016 (LMHyC)
Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883	Cepa de referencia aislada de guerreros heridos de Centros Médicos de Fort Sam Houston, San Antonio Texas y Maryland, USA.	Arivett *et. al,* 2015
***E. coli* HB101**	*Δ rec A* *Δ* rpsL20 (Str^R)	Boyer and Roulland-Dussoix (1969)
pKD46	*repA*101 (ts), ori pSC101, araC, (tL3), ParaB, sistema lambda red: gam-bet-exo. Amp^R	Datsenko and Wanner (2000)
pBSL193*	f1ori, pT7, MCS, p lac, CAP, oligos KS, SK, pimers M13, Amp^R, Tc^R.	Alexeyev *et. al,* 1995
pKD46ΩTc^R	pKD46 se clono un cassete de resistencia a Tc (ΩTc^R).	Este trabajo
pKD4	Amp^R, Km^R, FRT::Km::FRT Templado para el PCR para el Sistema lambda red	Datsenko and Wanner (2000)

* La cepa de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 fue proporcionada por la Dra. Verónica Quintero Hernández y el plásmido pBSL193 fue proporcionado por el Dr. Miguel Castañeda Lucio.

VII.2.- Condiciones de cultivo

Las cepas de *K. pneumoniae* así como las de *E. coli* fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB), incubadas a 37°C en agitación en casos necesarios se usó agar con un porcentaje de 1.5 %. Medio LB para 1000 ml, peptona de caseína (10 g/L), extracto de levadura (5g/L), cloruro de sodio (5g/L), pH de 7.20 con Na0H 1M. Los antibióticos utilizados fueron: Tetraciclina (Tc) a 30 µg/ml, Kanamicina (Km) a 50 µg/ml y Ampicilina (Amp) a 100 µg/ml.

VII.3.- Mantenimiento de las cepas

Las cepas fueron sembradas en tubos con 3 ml de caldo LB incubadas en agitación durante 24 horas a 37°C. Cumplido el tiempo se tomaron 600 µl del cultivo líquido y fueron colocados en crioviales con 600 µl de glicerol. Se homogenizaron con ayuda de un vórtex. Posteriormente los crioviales fueron almacenados en un ultracongelador a una temperatura de -72°C donde permanecieron almacenadas.

VII.4.- Condiciones de amplificado del gen *shv* para *Klebsiella pneumoniae*

Para la amplificación por PCR del gen *shv* de 231 pb se hizo usando oligosproporcionados por el laboratorio LMHyC, el oligo delantero de 19 pb, con una Tm de 51.1°C, con un contenido de GC de 53% con la secuencia 5' AGATCCACTATCGCCAGCA 3' y el oligo reverso de 19 pb, con una Tm de 49.7°C, con un contenido de GC de 45% con la secuencia 3' TCATTCAGTTCCGTTTCCCA 5´, las condiciones que se empelaron para esta PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, treinta ciclos comprendidos por desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 50°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos, finalizando con una temperatura de mantenimiento de 4°C (Figura 8).

La mezcla de reacción se preparó con: 15.84 µl de agua estéril, 2 µl del buffer de reacción, 0.5 µl de dNTP's 25mM, 2 µl de $MgCl_2$ 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido delantero 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido reverso 25mM, 0.25 µl de Taq polimerasa y 2 µl de DNA templado.

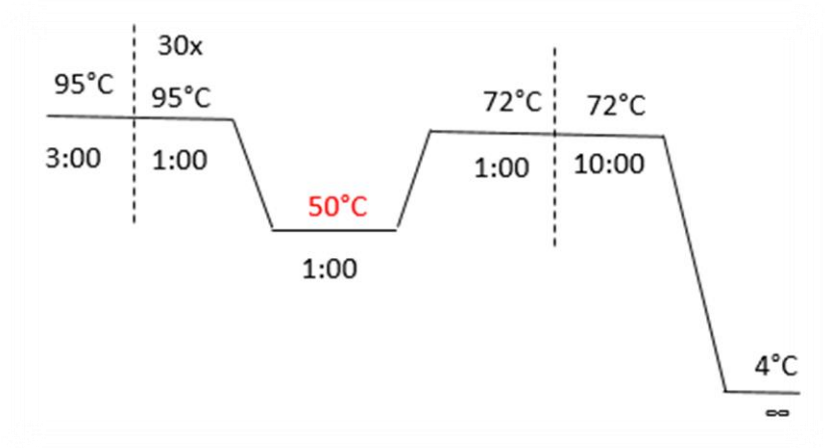


Figura 8. Protocolo para PCR del gen *shv*. Se muestran las condiciones seguidas en el termociclador para la amplificación del gen de la betalactamasa.

VII.5.- Extracción de plásmido

La extracción de los plásmidos pKD46, pBSL193, pKD4 y pKD46ΩTc^R se hizo por las siguientes técnicas:

La extracción de DNA plasmídico (QUICK PREP) se realizó mediante la técnica de Sambrook and Russell (2001) (ver anexos).

En técnicas más estrictas donde se requería una extracción más pura y concentrada se realizó por medio de Kit de extracción de plásmido: ZR Plasmid Miniprep- Kit de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Para la extracción de DNA plasmídico de las cepas de *K. pneumoniae* tanto la cepa 003 y la cepa ATCC 13883 se realizó por medio del modificado de la técnica de Sambrook *et. al*, 1989 (ver anexos).

VII.6.- Clonación

La restricción en el vector pKD46 se llevó a cabo con la enzima de restricción *XmnI* siguiendo las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific) y en el vector pBSL193 con las enzima de restricción *SmaI* siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen).

La purificación de banda de los productos a ligar a partir del gel de agarosa se utilizó el Kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de Zymo Research. Se cortó el fragmento de agarosa con ayuda de un bisturí (no se dejó mucho tiempo en luz UV debido a mutaciones) y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se añadieron 3 volúmenes de la solución ADB por cada volumen de gel de agarosa. Posteriormente se incubó a 55°C durante 10 min hasta que el fragmento de agarosa se disolvió completamente. Se transfirió la solución de agarosa disuelta a una columna y un tubo recolector (de a 500 µl), se centrifugó durante 1 minuto a 12000, se descartó el fluido recuperado, inmediatamente se añadieron 200 µl del buffer de lavado y se centrifugó durante 30 segundos a 12000 rpm y se descartó el fluido. El lavado se repitió una segunda vez más. Para eluir el DNA la columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 30 µl de buffer de elusión (previamente calentado en termoblog por 4 minutos a 60°C) se fueron colocando de a 10 µl (en el centro sin tocar las paredes) esperando 1 minuto para después centrifugar durante 60 segundos a 12000 rpm. La ligación se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen). Se analizaron las clonas por patrón de digestión con enzimas de restricción para la construcción pKD46ΩTc^{R} con *HindIII* y *BamHI* siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen).

VII.7.- Transformación por choque térmico en células químicamente competentes

El siguiente método se utilizó para generar células de *E. coli* HB101 químicamente competentes. De una criovial de la cepa HB101 se sembró en una placa de agar LB, se dejó incubar toda la noche a 37°C. Al día siguiente de la placa se tomó una colonia para sembrarla en un tubo de 3ml de LB y se dejó crecer por 16-18 horas en agitación a 37°C (precultivo). De este precultivo se tomaron 250 µl para sembrarlo e un matraz de LB de 50 ml y agitó a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6- 0.8 (aproximadamente 2- 3 horas). Una vez

alcanzada la DO se puso a enfriar en hielo por 20 minutos, y se transfirió el cultivo a tubos fríos estériles para centrifuga, se recolectaron las células por centrifugación a 10 min x 10000 rpm, 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió las células con puntas frías lentamente con 20 ml de solución fría de 200 mM$CaCl_2$ (siempre se mantuvieron los tubos en hielo). Después enfrió por 30 min en hielo, para luego centrifugar a 10 min x 10000 rpm, 4°C, nuevamente se decantó el sobrenadante y se resuspendió las células con puntas frías lentamente con 20 ml de solución fría de 200 mM $CaCl_2$, se dejó enfriar por 30 min en hielo y nuevamente se centrifugó a 10 min x 10000 rpm, 4°C, se eliminó el sobrenadante. Finalmente se resuspendió las células en 500 µl (a cada tubo) de la solución previamente mezclada en un tubo de 750 µl 200 mM $CaCl_2$ + 300 µl de glicerol, para luego alicuotar en tubos fríos eppendorf de a 100 µl. Se mantuvieron los tubos en el refrigerador de -20°C por 24 horas y después se almacenaron a -72°C (Sambrook and Russell, 2001).

La transformación por choque térmico se llevó a cabo de la siguiente manera. Una vez terminadas las células competentes se tomó un tubo y se añadió la reacción de ligación, esta mezcla se mantuvo 30 minutos en hielo y seguidamente se procedió al choque térmico incubándola durante 1 minuto a 42ºC. A continuación se incubó de nuevo en hielo durante 10 minutos y se añadió 1 ml de medio SOC (super optimal broth plus glucose). Las transformaciones se incubaron durante 2 horas en agitación a 30 °C. Finalmente las bacterias se sembraron en placas de LB-agar, suplementadas con el antibiótico correspondiente para la selección de los transformantes y se incubaron a 30°C (Sambrook and Russell, 2001).

VII.8.- Transformación mediante electroporación del plásmido pKD46ΩTc^R en *K. pneumoniae* cepas 003 y ATCC13883

El siguiente método se utilizó para generar células electrocompetentes de *K. pneumoniae* cepas 003 y ATCC13883. De una criovial de la cepas 003 y ATCC13883 se sembró en una placa de agar LB (pH= 8 ajustado con NaOH 1M) + Amp, se dejó incubar toda la noche a 37°C, al día siguiente de la placa se tomó una colonia para sembrarla en un tubo de 3 ml de LB (pH= 8 ajustado con NaOH 1M) + Amp y se dejó crecer por 16-18 horas en agitación a 37°C (precultivo). De este precultivo se tomó 1ml para sembrarlo e un matraz de LB (pH= 8 ajustado con NaOH 1M) de 100 ml y se puso agitar a 30°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de

0.6- 0.8 (aprox. 2- 3 horas). Una vez alcanzada la DO se puso a enfriar en hielo por 10 minutos, y se transfirió el cultivo a tubos fríos estériles para centrifuga, se recolectaron las células por centrifugación a 5 min x 6500 rpm, 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió las células con puntas frías lentamente con 7 ml de agua TDE estéril al 10% de glicerol (grado biología molecular) (siempre se mantuvieron los tubos en hielo), después se volvió a centrifugar por 5 min x 6500 rpm, 4°C, nuevamente se decantó el sobrenadante y se resuspendió las células con puntas frías lentamente con 7 ml de agua TDE estéril al 10% de glicerol (grado biología molecular) y nuevamente se centrifugó a 5 min x 6500 rpm, 4°C, se eliminó el sobrenadante. Finalmente se resuspendió las células en 500 µl (a cada tubo) de agua TDE estéril al 10% de glicerol (grado biología molecular) se resuspendió lentamente y se pasaron a un tubo eppendorf y se centrifugó por 2 min a 12,000 rpm, 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de agua TDE estéril al 10% de glicerol (grado biología molecular) (Huang *et. al*, 2014).

A una cubeta de electroporación de 2 mm Gene Pulser (Bio-Rad) (previamente esterilizadas en luz UV por 20 min) se agregó 50 µl de células electrocompetentes y se agregó 400 ng/µl (medir al nanodrop) del plásmido pKD46ΩTc^{R}. Para la electroporación se utilizó un electroporador Eppendorf Multiporator a un voltaje de descarga de 2.5 V, con una duración del pulso de 5 ms. Tras el choque eléctrico las bacterias se recuperaron en 500 µl de medio SOC se transfirieron a un tubo eppendorf donde se agregó otros 500 µl de medio SOC y se incubaron durante 1 hora en agitación a 30°C. Finalmente se paquearon 200 µl de muestra y 100 µl de muestra concentrada (2 min, 12000 rpm) en placas de LB agar, suplementadas con tetraciclina a 35 µg/ml y se incubaron a una temperatura de 30°C.

VII.9.- PCR por colonia

Esta técnica se utilizó para analizar las diferentes posibles clonas que se obtuvieron. En tubos eppendorf se colocaron 20 µl de agua pisa estéril y se tomó un conjunto (pool) de 5 colonias por tubo (con palillos estériles), después se puso a hervir por 20 minutos (una vez que está hirviendo el agua se colocó la gradilla) cuando se enfriaron los tubos se centrifugaron 5 minutos a 12000 rpm, finalmente se tomó el sobrenadante como templado para la PCR.

Para la amplificación del gen de resistencia a Tetraciclina (Tc^R) de 1213 pb se hizo por PCR, usando el oligonucleótido Tc-F delantero de 20 pb, con una Tm de 55.9°C, con un contenido de GC de 60% con la secuencia 5' CGCAGTCAGGCACCGTGTAT3' y el oligonucleótido Tc-R reverso de 20 pb, con una Tm de 57.9°C, con un contenido de GC de 65% con la secuencia 5' CCATTCAGGTCGAGGTGGCC 3´, las condiciones que se empelaron para esta PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, treinta ciclos comprendidos por desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 62°C por 40 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto 10 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos, finalizando con una temperatura de mantenimiento de 4°C (Figura 9).

La mezcla de reacción se preparó con: 6.425 µl de agua estéril, 1 µl del buffer de reacción, 0.25 µl de dNTP's 25mM, 1 µl de $MgCl_2$ 25mM, 0.6 µl del oligonucleótido delantero 25mM, 0.6 µl del oligonucleótido reverso 25mM, 0.125 µl de Taq polimerasa y 2.5 µl de DNA como templado.

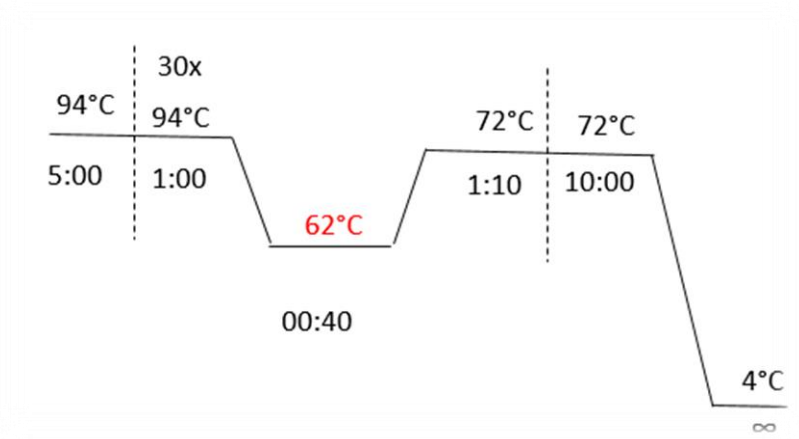


Figura 9. Protocolo para PCR del cassete de resistencia a tetraciclina (Tc^R). Se muestran las condiciones seguidas en el termociclador para la amplificación del gen de resistencia a tetraciclina.

VII.10.- PCR del producto *pilA*/Km^R

Para la amplificación del producto de PCR *pilA*/Km^R de 1517 pb, se diseñó el oligonucleótido F*pilAKpn*mut delantero, de 60 pb, con una Tm de 72.8°C, con un contenido de GC de 47% con la secuencia 5' ATGGATAAACAACGAGGTTTTACCCTGATTGAACTGATGGGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC 3' y el oligonucleótido R*pilAKpn*mut reverso, de 60 pb, con una Tm de 75.6°C, con un contenido de GC de 53% con la secuencia 5' CGCCCTCACTTCACCCGGAAAACGTCTTCGCAGGCCTGCTCATATGAATATCCT CCTTAG 3´, las condiciones que se empelaron para esta PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto, treinta ciclos comprendidos por desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 47.2°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto 40 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos, finalizando con una temperatura de mantenimiento de 4°C (Figura 10).

La mezcla de reacción se preparó con: 80.2 µl de agua estéril, 10 µl del buffer SO_4Mg 50mM, 1.6 µl de dNTP's 25mM, 1.5 µl del oligonucleótido delantero 25mM, 1.5 µl del oligonucleótido reverso 25mM, 1.2 µl de Pfu y 4 µl de DNA como templado.

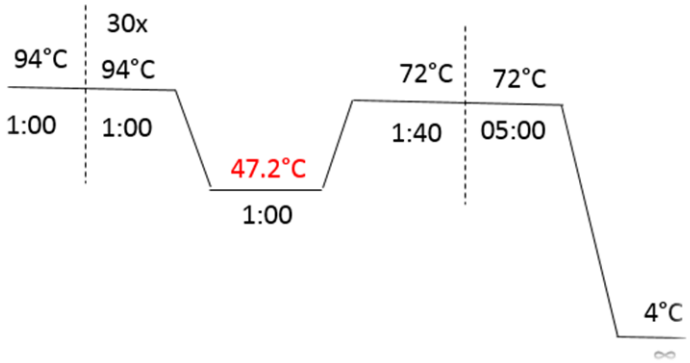


Figura 10. Protocolo para PCR del producto *pilA*/Km^R. Se muestran las condiciones seguidas en el termociclador para la amplificación del gen *pilA*/Km^R.

VII.11.- Condiciones de PCR para amplificar *tetA*

Para la amplificación del gen *tetA* de 937 pb se hizo por PCR, usando oligos proporcionados por el laboratorio LMHyC, el oligo delantero TetA1-F de 20 pb, con la secuencia 5'GTAATTCTGAGCACTGTCGC3' y el oligo reverso TetA1-R de 20 pb, con la secuencia 3'CTGCCTGGACAACATTGCTT 5´, las condiciones que se empelaron para esta PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, veintitrés ciclos comprendidos por desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 62°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos, finalizando con una temperatura de mantenimiento de 4°C.

La mezcla de reacción se preparó con: 10.85 µl de agua estéril, 2 µl del buffer DreamTaq de reacción, 0.5 µl de dNTP's 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido delantero 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido reverso 25mM, 0.25 µl de Dream Taq polimerasa y 4 µl de DNA templado.

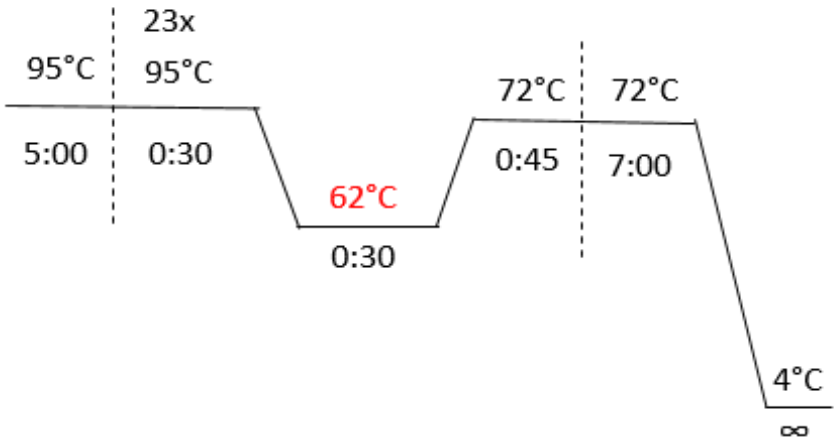


Figura 11. Protocolo para PCR del producto *tetA*. Se muestran las condiciones seguidas en el termociclador para la amplificación del gen *tetA*.

VII.12.- Condiciones de PCR para amplificar *tetB*

Para la amplificación del gen *tetB* de 659 pb se hizo por PCR, usando oligos proporcionados por el laboratorio LMHyC, el oligo delantero TetB1-F de 20 pb, con la secuencia 5'TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG3' y el oligo reverso TetB1-R de 20 pb, con la secuencia 3'GTAATGGGCCAATAACACCG 5´, las condiciones que se empelaron para esta PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, treinta y cinco ciclos comprendidos por desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 52°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos, finalizando con una temperatura de mantenimiento de 4°C.

La mezcla de reacción se preparó con: 10.85 µl de agua estéril, 2 µl del buffer DreamTaq de reacción, 0.5 µl de dNTP's 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido delantero 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido reverso 25mM, 0.25 µl de Dream Taq polimerasa y 4 µl de DNA templado.

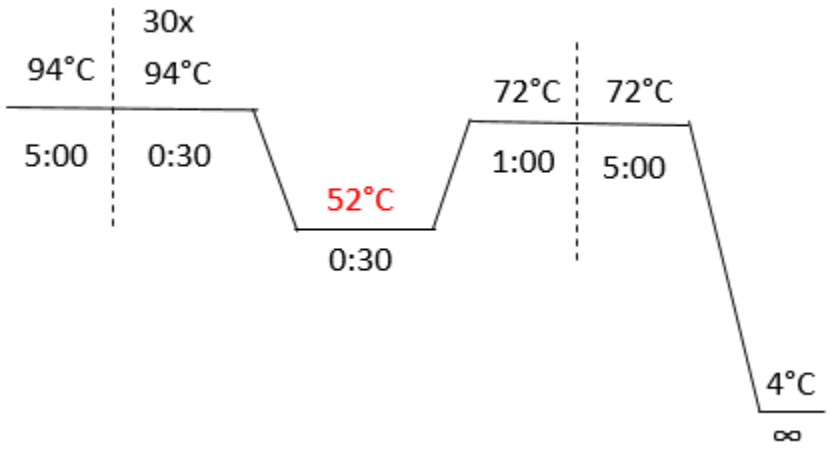


Figura 12. Protocolo para PCR del producto *tetB*. Se muestran las condiciones seguidas en el termociclador para la amplificación del gen *tetB*.

VII.13.- Condiciones de PCR para amplificar *catA1*

Para la amplificación del gen *catA1* de 630 pb se hizo por PCR, usando oligos proporcionados por el laboratorio LMHyC, el oligo delantero catA1-F de 20 pb, con la secuencia 5' CACTGGATATACCACCGTTG 3' y el oligo reverso catA1-R de 20 pb, con la secuencia 3' CACTCATCGCAGTACTGTTG 5', las condiciones que se empelaron para esta PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, treinta ciclos comprendidos por desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos, finalizando con una temperatura de mantenimiento de 4°C.

La mezcla de reacción se preparó con: 10.85 µl de agua estéril, 2 µl del buffer DreamTaq de reacción, 0.5 µl de dNTP's 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido delantero 25mM, 1.2 µl de oligonucleótido reverso 25mM, 0.25 µl de Dream Taq polimerasa y 4 µl de DNA templado.

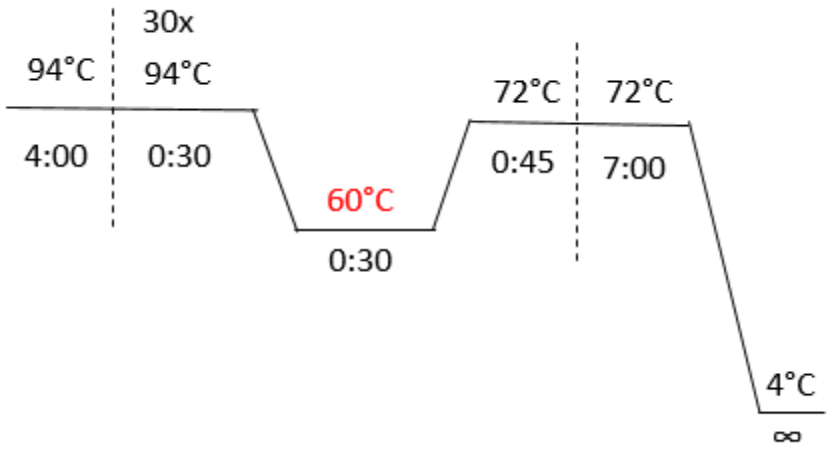
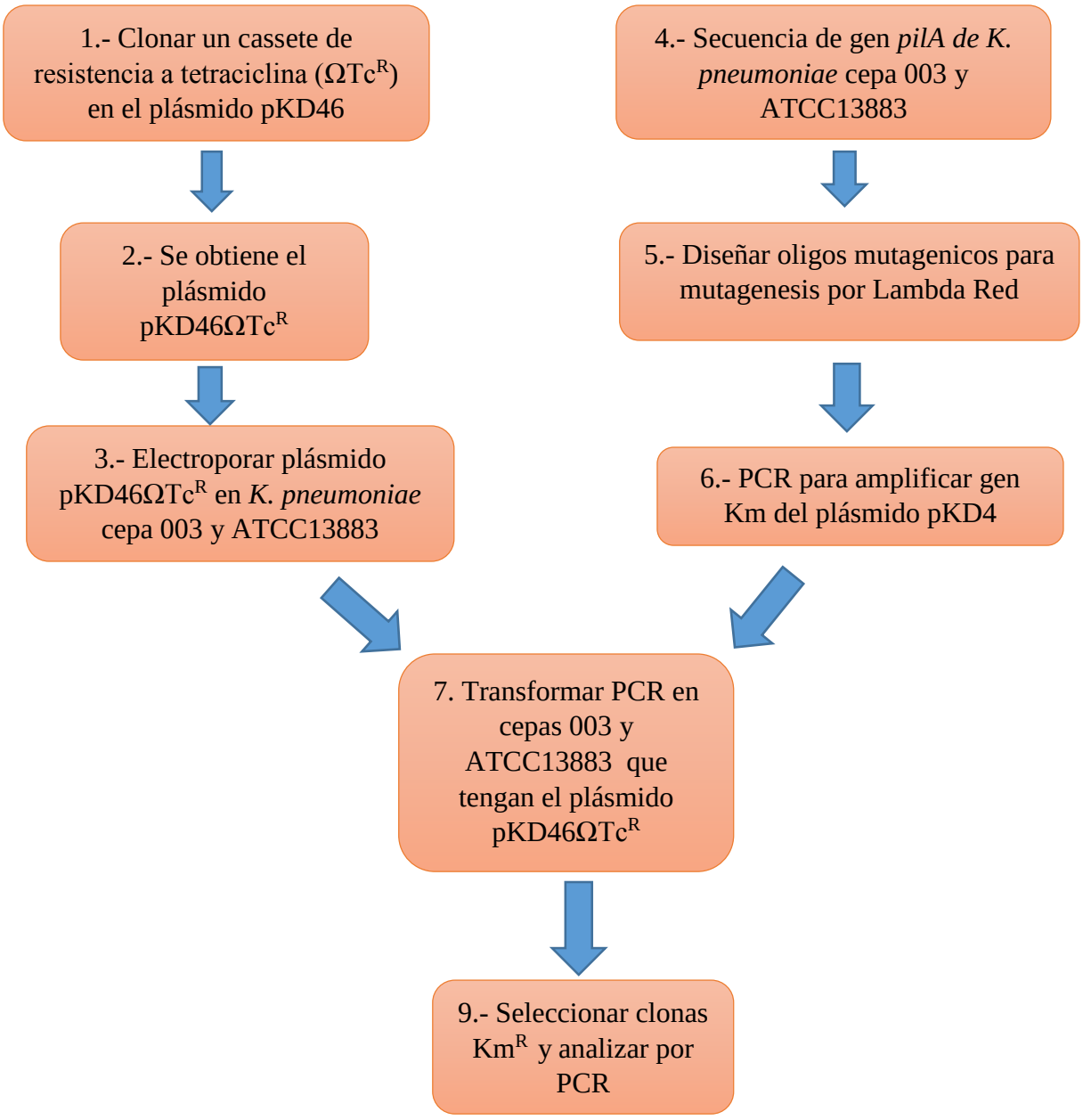


Figura 13. Protocolo para PCR del producto *catA1*. Se muestran las condiciones seguidas en el termociclador para la amplificación del gen *catA1*.

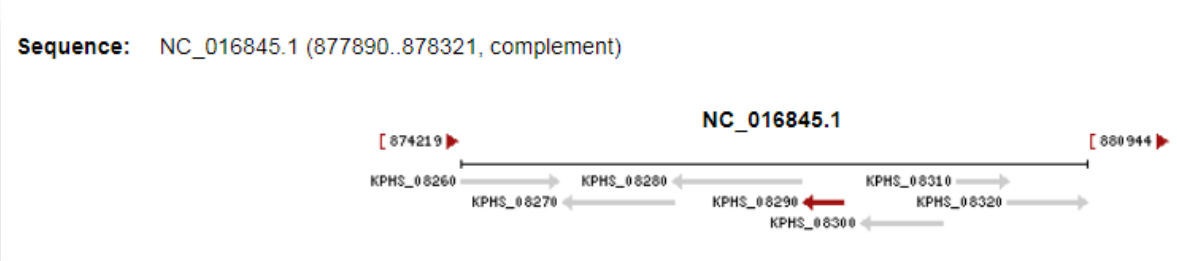
VIII.- ESQUEMA EXPERIMENTAL



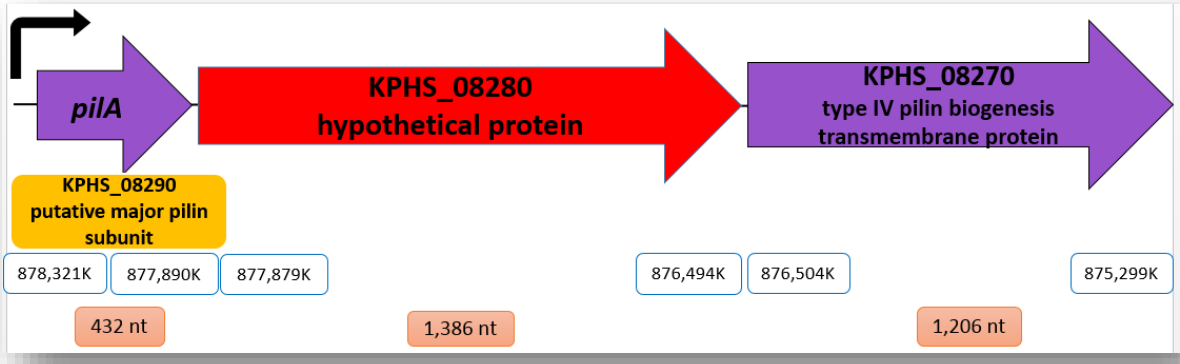
IX. RESULTADOS

IX. 1.- Análisis del contexto genético de la secuencia *pilA*

Basándonos en nuestros antecedentes, se investigó el contexto genético del gen *pilA*, nos basamos en el genoma de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, reportado en el NCBI con la clave NC_016845.1. La secuencia putativa de *pilA* esta reportada como putative major pilin subunit con clave KPHS_08290 que aledañamente rio abajo tiene los genes de una proteína hipotética de un tamaño de 1386 nt registrada con la clave KPHS_08280, seguido de una proteína transmembrana de biogénesis de pilina tipo IV de un tamaño de 1206 nt, registrada con la clave KP_08270. (Figura 14 a y b).



14(a). Contexto genético de la secuencia de la pilina, se observa marcada con la flecha roja con el número de clave KPHS_08290.



14(b). Diagrama del contexto genético de la secuencia de la pilina (KP_08290), se describen los genes continuos rio abajo, proteína hipotética (KP_08280), proteína transmembrana de biogénesis de pilina tipo IV (KP_08270), la flecha negra predice un posible promotor que regula a los genes.

Además se le realizó un blastn a la proteína hipotética KPHS_08280, se pudo encontrar que la proteína es parecida a la proteína GspE del sistema de secreción tipo II, una ATPasa que es responsable de proporcionar energía para el proceso de translocación de proteínas. Además se observa que este gen está muy conservado en diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 15).

Source (All)	CDS Region in Nucleotide	Protein	Name	Organism	Strain	Assembly
INSDC	CP034420.1 2291746-2293131 (+)	QGM52401.1	type II secretion system protein GspE	Klebsiella pneumoniae	C1398	
RefSeq	NC_009648.1 127520-128905 (-)	WP_004145935.1	type II secretion system protein GspE	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578	ATCC 700721; MGH 78578	GCF_000016305.1
RefSeq	NC_012731.1 912908-914293 (-)	WP_004145935.1	type II secretion system protein GspE	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044	NTUH-K2044	GCF_000009885.1
RefSeq	NC_016845.1 876494-877879 (-)	WP_004145935.1	type II secretion system protein GspE	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286	HS11286	GCF_000240185.1
RefSeq	NC_017540.1 643230-644615 (-)	WP_004145935.1	type II secretion system protein GspE	Klebsiella pneumoniae KCTC 2242	KCTC 2242	GCF_000220485.1
RefSeq	NC_018522.1 4439260-4440645 (+)	WP_004145935.1	type II secretion system protein GspE	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084	1084	GCF_000294365.1

Figura 15. Tabla de relación de la proteína GspE del sistema de secreción tipo II que se encuentra en diferentes cepas de *K. pneumoniae*.

Por otro lado se buscó en el NCBI las proteínas necesarias para que se ensamble el pili tipo IV, las que estan reportadas en *K. pneumoniae*, se encontraron las siguientes proteínas **PilT** conservada proteína hipotética de *K. pneumoniae* cepa K45-67 reportada con la clave D647_p35026, en la misma cepa BK15692 de *Klebsiella pneumoniae* se encontró **pilQ** reportada con la clave D647_p36029, **PilN** repotada con la clave D647_p36032, **PilM** reportada con la clave D647_p36033, **PilO** reportada con la clave D647_p36031 y **PilP** reportada con la clave D647_p36030.

IX. 2.- Confirmación como *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* de la cepas 003 (aislado clínico) y la cepa ATCC 13883 (cepa de referencia)

Con el propósito de confirmar si las cepas *K. pneumoniae* 003 (aislado clínico) y la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 (cepa de referencia) son *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, se realizaron pruebas bioquímicas, así como la amplificación del gen *shv* por PCR.

Las pruebas bioquímicas que se hicieron fueron, CITRATO, TSI, LIA y MIO, el resultado que se obtuvo para la cepas 003 y ATCC13883 fue CITRATO+ ya que se observó que viro al color azul, indicando que la bacteria utiliza el citrato como fuente de carbono. Para la prueba TSI en las cepas 003 y ATCC13883 el resultado que se obtuvo fue TSI + el tubo se observó todo amarillo con producción de gas en el medio indicando que la bacteria fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, el gas se debe al CO_2 producto de la fermentación. Para la prueba LIA en las cepas 003 y ATCC13883 el resultado que se obtuvo fue LIA+ se observó el tubo como un viraje hacia el color púrpura en todo el medio de cultivo, debido a la actividad de la lisina descarboxilasa, así como también indica un pH alcalino. Para el resultado de la prueba MIO, en la cepa 003 se observó turbiedad en el tubo lo que indico Movilidad +, la prueba de Indol, el resultado fue Indol- ya en el medio se observó formación de un anillo color amarillo en la superficie, para la prueba de Ornitina, el resultado fue Ornitina – no se llevó a cabo la descarboxilación de la ornitina ya que se observó en el fondo del tubo un color amarillo. Para el resultado de la prueba MIO, en la cepa ATCC13883 se observó el crecimiento solo a lo largo de la línea de siembra lo que indico Movilidad –, el resultado fue Indol- ya en el medio sobresale la formación de un anillo color amarillo en la superficie, para la prueba de Ornitina, el resultado fue Ornitina – no se llevó a cabo la descarboxilación de la ornitina ya que se observó en el fondo del tubo un color amarillo (Figura 16 y 17).

Tabla 2. Resultado de las pruebas bioquímicas de la cepa 003 y ATCC 13883 comparando con lo reportado para la bacteria *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae**.

	CITRATO	TSI	LIA	MOVILIDAD	INDOL	ORNITINA
K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae	+	+	+	-	-	-
003	+	+	+	+	-	-
ATCC 13883	+	+	+	-	-	-

* Podschun and Ullmann, 1998; Brisse *et. al*, 2006.

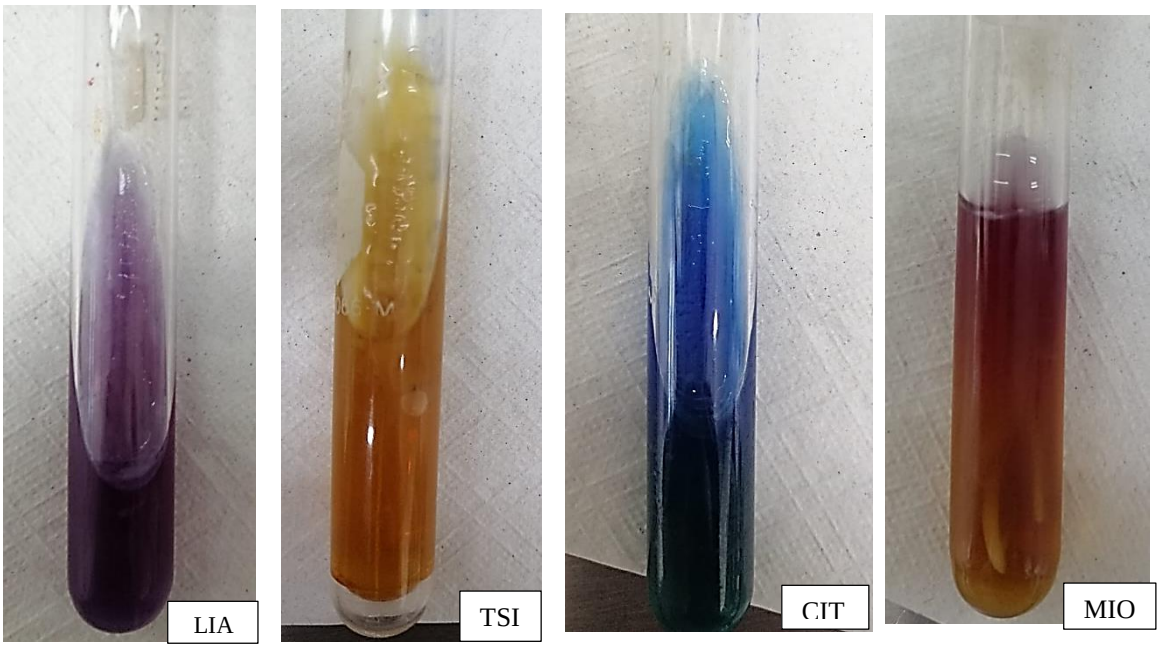
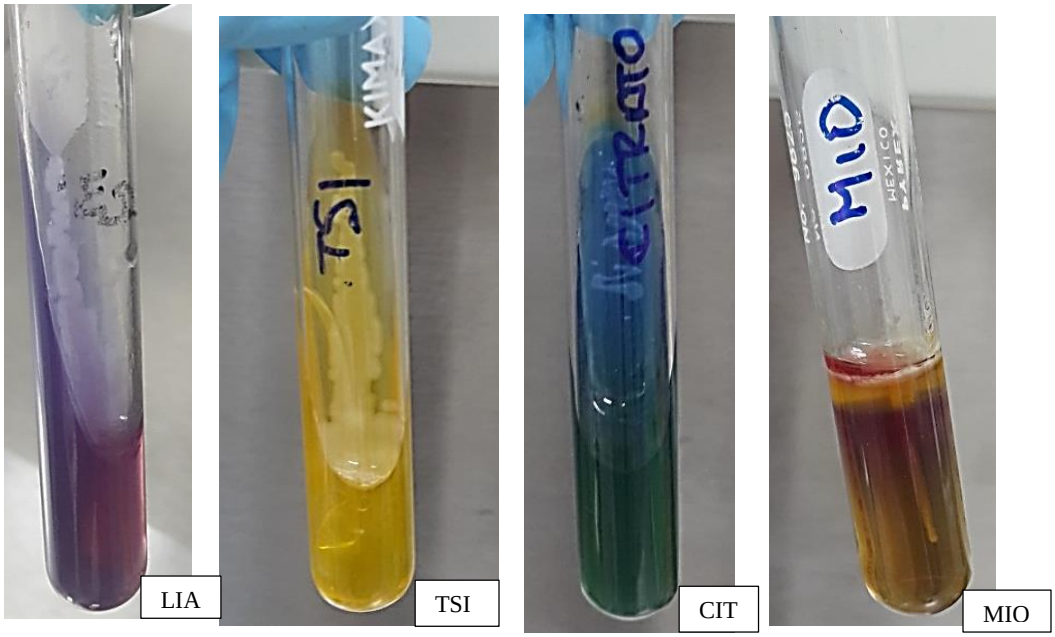


Figura 16. Pruebas bioquímicas de la cepa *K. pneumoniae* 003 el resultado indico LIA +, TSI +, CITRATO +, y MIO: Movilidad +, Indol - y Ornitina -.



.

Figura 17. Pruebas bioquímicas de la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 el resultado indico LIA +, TSI +, CITRATO +, y MIO: Movilidad -, Indol - y Ornitina -.

Adicionalmente se amplificó por PCR el gen *shv* que codifica para una betalactamasa intrínseca (en cromosoma) en *K. pneumoniae*. El resultado para la cepa *K. pneumoniae* 003 arrojó la amplificación del gen *shv* de 231 pb (Figura 18 carril 2 y 3). Mientras que para la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 arrojó la amplificación de otras bandas inespecíficas ninguna coincidió con el tamaño esperado de 231 pb (Figura 18, carril 1), se metió un control negativo que corresponde al último carril.

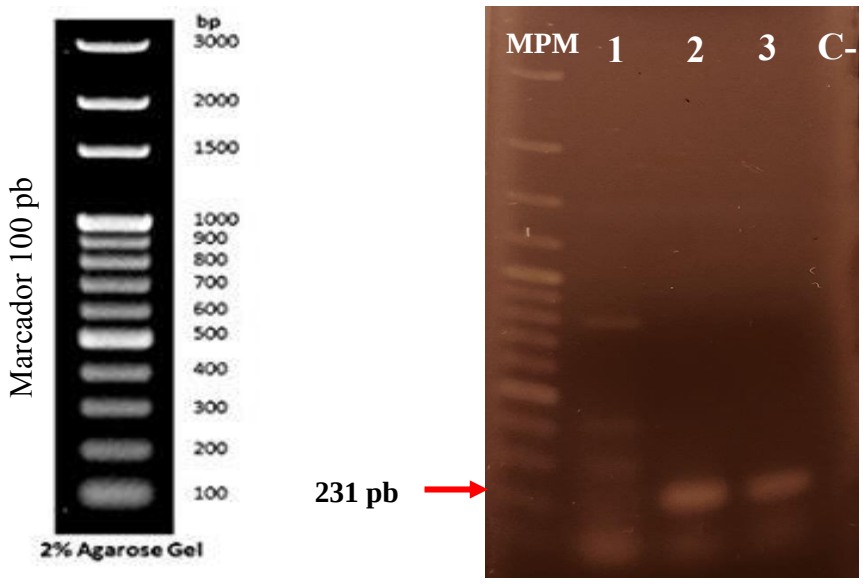


Figura 18. Amplificación del gen *shv* de las cepas 003 y ATCC 13883. Carril MPM: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1 corresponde a la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883, carril 2 y 3 corresponde a la cepa *K. pneumoniae* 003, C-: control negativo.

IX. 3.- Extracción de plásmido de las cepas de *K. pneumoniae* 003 y ATCC 13883

Con el fin de conocer si las cepas en estudio poseen plásmidos se les realizó extracción plasmídica por el método de Sambrook and Russell. (Sambrook and Russell, 2001). El resultado de la extracción nos indicó que las cepas *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *K. pneumoniae* 003 no arrojan un perfil plasmídico, las bandas que se observan en la cepa podrían corresponder a DNA genómico mientras que en la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 no se observa ninguna banda. Como control se hizo extracción a otra cepa de *K. pneumoniae* ATCC 13883 y a la cepa HB101 que posee el plásmido pKD46 (Figura 19).

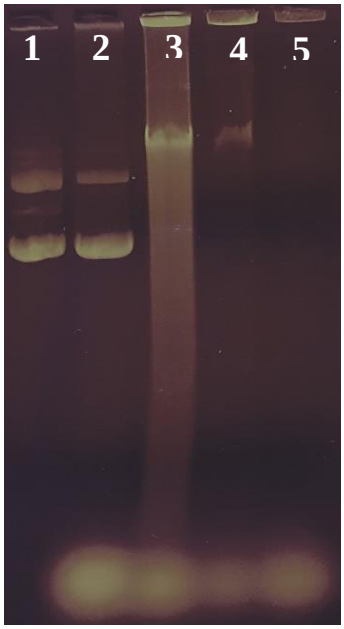


Figura 19. Extracción de plásmido de las cepas 003 y ATCC 13883. El carril 1 y 2 corresponde a extracción del control plásmido pKD46, carril 3 corresponde a extracción de plásmido del control cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603, carril 4 corresponde a extracción de plásmido de la cepa *K. pneumoniae* 003 y el carril 5 corresponde a extracción de plásmido de la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883.

IX. 4.- Diseño de Oligonucleótidos para amplificar el cassete de resistencia a tetraciclina y para amplificar el producto de PCR *pilA*/Km^{R} para la mutación por el sistema lambda red

Para amplificar el cassete de resistencia tetraciclina, el diseño de oligonucleótidos se realizó a partir de la secuencia del plásmido pBSL193 el cual posee dicho cassete de resistencia. La secuencia del plásmido fue descargada en el programa SnapGene Viewer (Alexeyev *et. al,* 1995), después se seleccionaron 20 pb de cada extremo del cassete de tetraciclina, en la cadena que va de 5’ – 3’ para el oligo delantero y en la cadena que va de 3’- 5’ para el oligo reverso (Figura 20).

Las características de los oligosse verificaron en el programa OligoCalc para que no hubiera apareamiento entre ellos ni que se formen estructuras secundarias como horquillas.

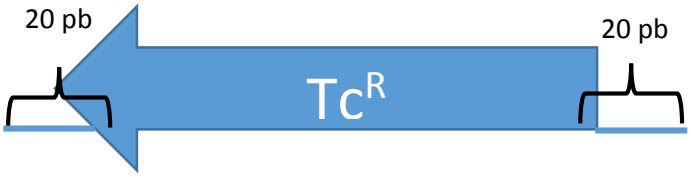


Figura 20. Esquema donde muestra cómo se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el cassete de resistencia a tetraciclina.

Para el diseño de oligos para amplificar el producto de PCR *pilA*/Km^R se tomó en cuenta tanto la secuencia del plásmido pKD4 que contiene el cassete de kanamicina como la secuencia del gen *pilA* de *Klebsiella pneumoniae*. A partir de la secuencia del plásmido pKD4 (Datsenko and Wanner, 2000), la cual fue descargada en el programa SnapGene Viewer, se seleccionaron 20 pb de cada extremo del cassete de Km. Ya que estos oligos van en conjunto con la secuencia del gen *pilA*, los oligos fueron diseñados para que cada uno incluyera 40 pb del gen de *pilA* en sus extremos 5' (Figura 21).

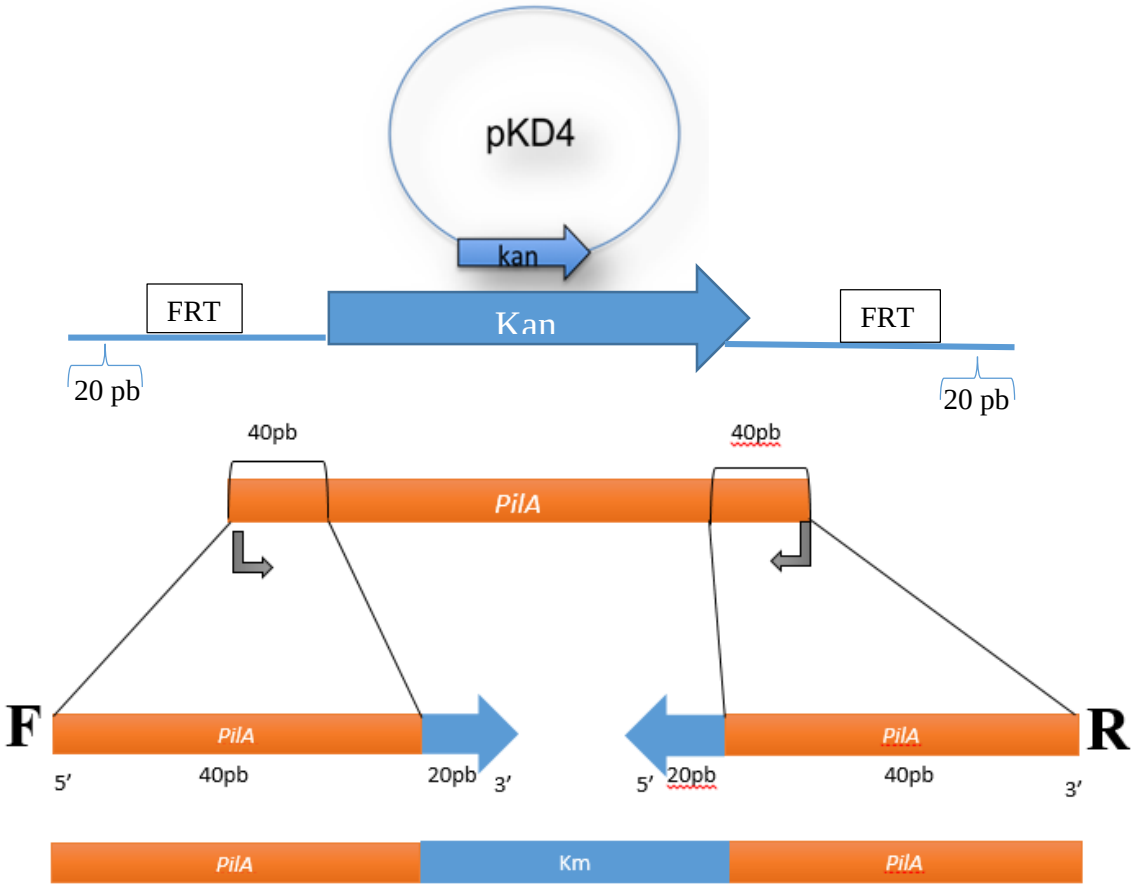


Figura 21. Esquema donde muestra cómo se diseñaron los oligonucleótidos para la mutación por el sistema lambda red. 40 pb corresponden al gen *pilA* y 20 pb corresponde al gen de resistencia a kanamicina.

IX. 5.- Construcción del vector pKD46ΩTc^{R}

Para llevar a cabo la mutación en el gen *pilA* en la cepas de *K. pneumoniae* se optó por el sistema lambda red utilizando el plásmido pKD46, pero debido a que *Klesbiella pneumoniae* es intrínsecamente resistente a ampicilina y este plásmido tiene un cassete de resistencia a ampicilina se tuvo que adecuar esta herramienta incluyendo un cassete de resistencia diferente. Se hicieron pruebas de sensibilidad a varios antibióticos y se determinó que el cassete que se podría insertar fue el de tetraciclina. Se hicieron intentos para eliminar el cassette de ampicilina y sustituirlo por el de tetraciclina pero no se obtuvieron clonas

transformantes por lo que se optó en clonar completamente el cassette de tetraciclina en un sitio interno del cassete de amplicilina.

Primeramente se hizo una restricción en el plásmido pKD46 con la enzima de restricción *XmnI* la cual se encuentra interrumpiendo el cassete de ampicilina en el nucleótido 6010 pb para linearizar el plásmido. La enzima *XmnI* dejó un corte en extremos romos y la restricción se verificó por electroforesis observando una banda con un tamaño de 6329 pb (Figura 22 A). Por otro lado, el cassete de resistencia tetraciclina (ΩTc^R) se liberó del plásmido pBSL193 utilizando la enzima *SmaI*, igualmente el corte de esta enzima dejó extremos romos, y se verificó por electroforesis observando una banda que corresponde a un tamaño de 2314 pb (Figura 22B). Ambos productos, plásmido pKD46 linearizado (vector) y el cassete de resistencia tetraciclina (inserto), fueron purificados por banda utilizando el Kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de Zymo Research. Se prosiguió a realizar la ligación de ambos productos para después transformar en la cepa HB101 de *E. coli*.

Una vez que se obtuvieron varias colonias transformantes, se analizaron como posibles clonas resembrando en placas de LB con tetraciclina y analizadas por PCR de colonia amplificando el cassete de tetraciclina con un tamaño de 1213 pb (Figura 23). Posteriormente se realizó extracción de plásmido de las clonas positivas al PCR observando un perfil plasmídico parecido al perfil de pKD46 pero con un aumento de tamaño de 2314 pb por la clonación del cassete de tetraciclina (Figura 24). Seguido de eso se comprobaron por restricción con las enzimas *HindIII* linearizando el plásmido pKD46ΩTc^R obteniendo una banda que corresponde a 8643 pb (Figura 25A) y con la enzima *BamHI* obteniendo dos bandas, una que corresponde a 4860 pb y una banda que corresponde a el tamaño de 3783 pb (Figura 25B). Finalmente se obtuvo la construcción del vector pKD46ΩTc^R quedando de un tamaño de 8643 pb (Figura 26).

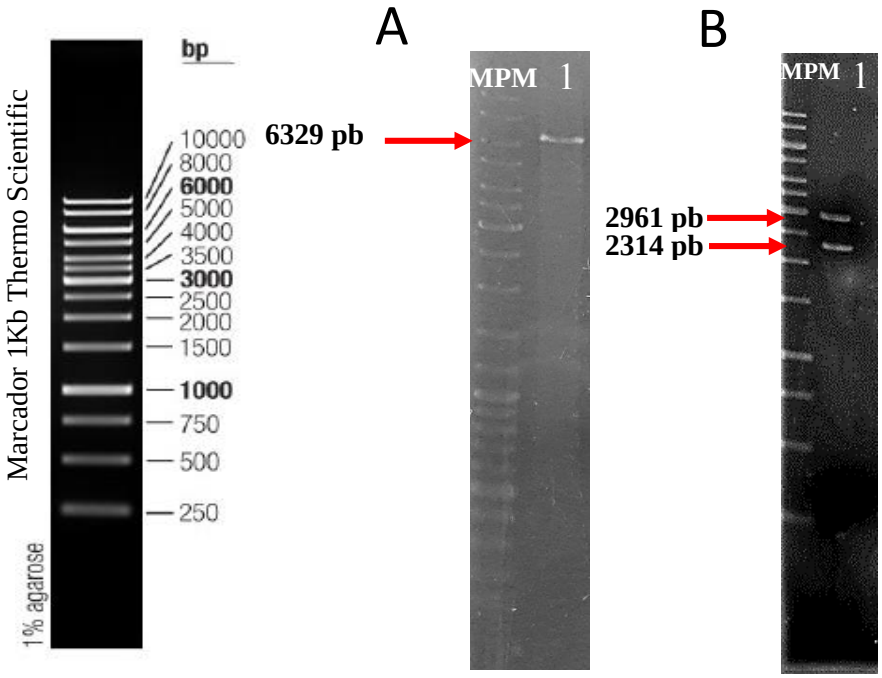


Figura 22. Restricción del plásmido pKD46 y restricción del plásmido pBSL193. A. Carril MPM: marcador de peso molecular de 1kb, carril 1: plásmido pKD46 linearizado con la enzima de restricción *XmnI*. B. Carril MPM: marcador de peso molecular de 1kb, carril 1: liberación del cassete de resistencia a tetraciclina del plásmido pBSL193 con la enzima de restricción *SmaI*.

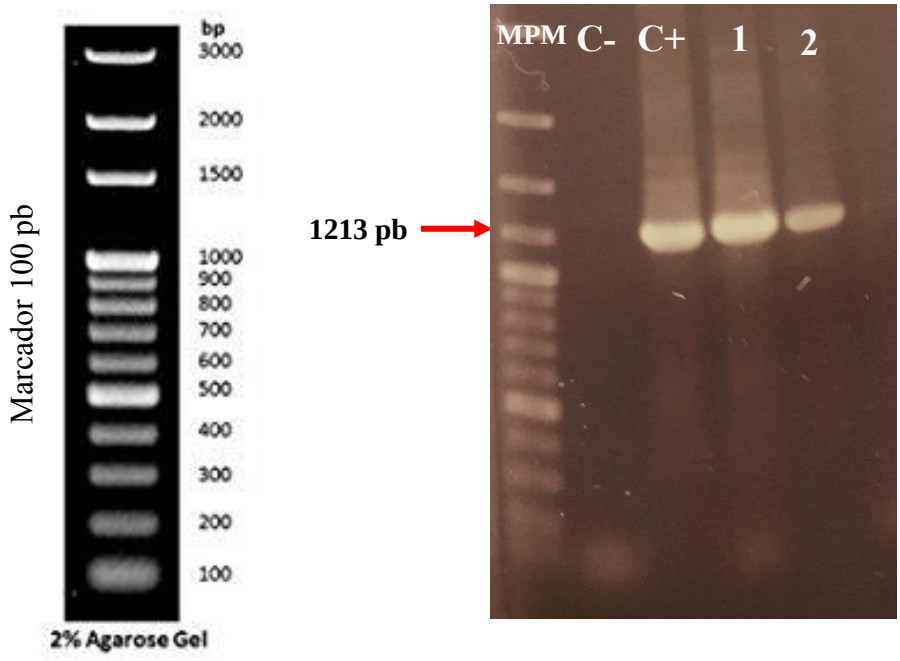


Figura 23. Comprobación de la construcción pKD46ΩTc^R por PCR. Carril MPM: marcador de peso molecular de 100 pb, C-: control negativo. C+: control positivo, carril 1 y 2: amplificación del cassete de resistencia a tetraciclina (ΩTc^R).

Figura 24. Extracción de plásmido de las posibles clonas. Carril 1 corresponde al control, el perfil plasmídico del plásmido original pKD46Amp^{R} y el carril 2 es el perfil plasmídico de la construcción pKD46ΩTc^{R}.

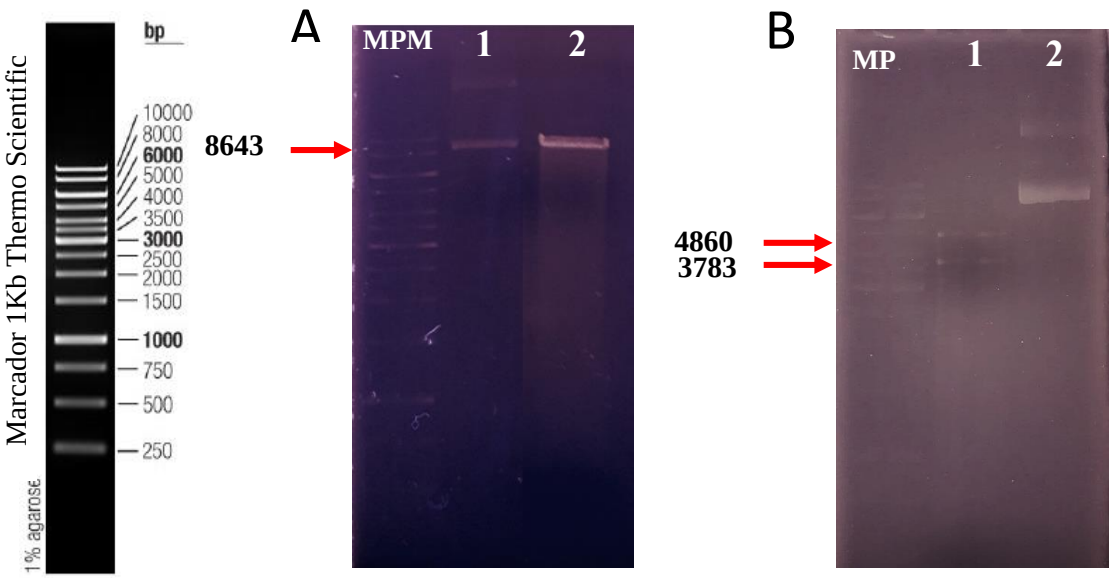


Figura 25. Comprobación de la construcción pKD46ΩTc^{R} por restricción. A. Carril MPM: marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1 plásmido sin digerir, carril 2 plásmido linearizado con la enzima de restricción *HindIII*. B. Carril MPM: marcador 1kb, carril 1: plásmido digerido con la enzima de restricción *BamHI*, carril 2: plásmido sin digerir.

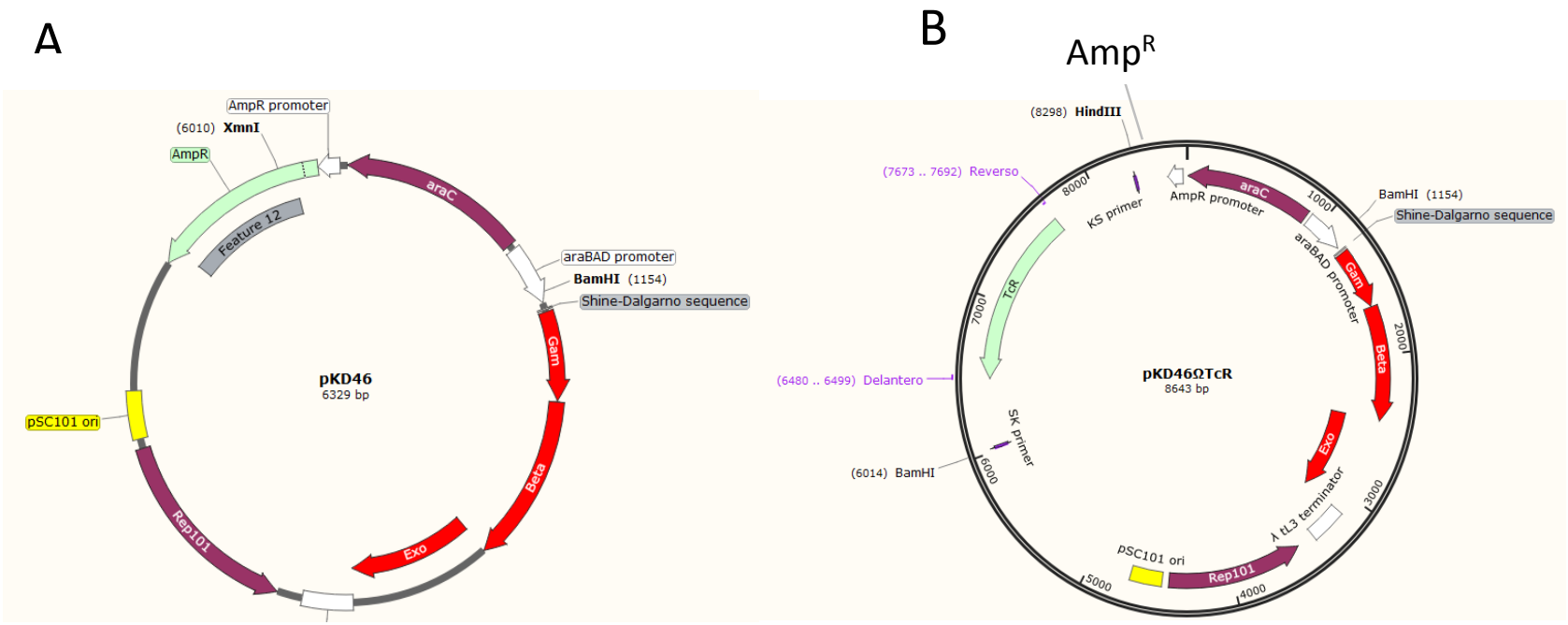


Figura 26. Plásmido pKD46 y plásmido pKD46ΩTc^R. A. Plásmido pKD46 original con el cassete de resistencia ampicilina de un tamaño de 6229 pb. B. Construcción del plásmido pKD46ΩTc^R, se clonó el cassette de tetraciclina en un sitio interno del cassete de ampicilina, lo que dio un tamaño del nuevo vector de 8643 pb.

IX. 6.- Amplificación del producto de PCR *pilA*/Km^R para la mutación por el sistema lambda red

Para llevar a cabo la mutación en el gen *pilA* en las cepas *K. pneumoniae* 003 y la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 por el sistema lambda red, es necesario un producto de PCR que contenga parte de un gen de resistencia y parte de la secuencia del gen a deletar *pilA*. Una vez que se confirmó la sensibilidad de estas cepas al antibiótico kanamicina, se eligió este cassete de resistencia para poder llevar a cabo la mutación. Para la amplificación del cassete de kanamicina se utilizó como templado el plásmido pKD4 utilizando los oligos diseñados en el presente trabajo. (Figura 21). La PCR arrojo el producto esperado de 1517 pb (Figura 27).

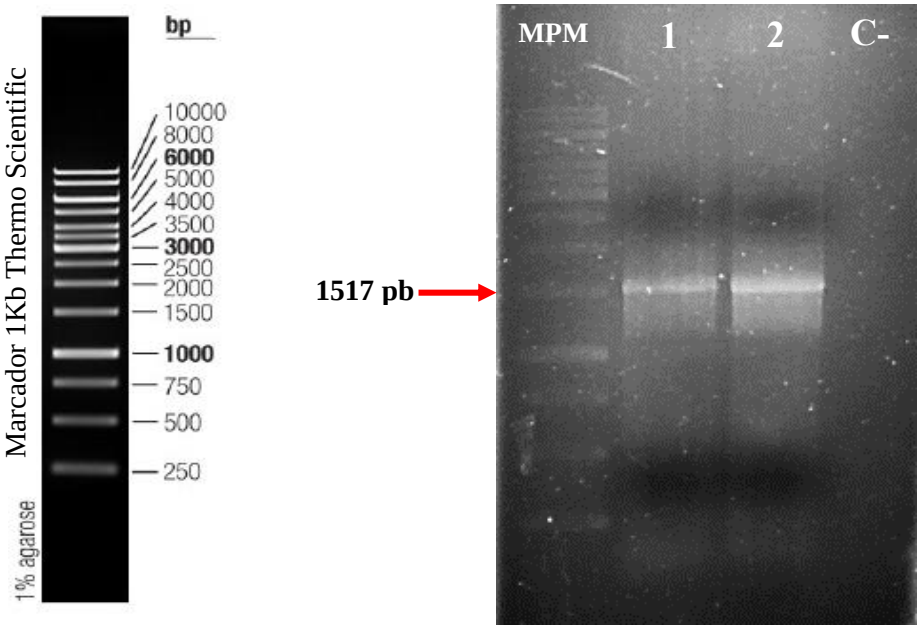


Figura 27. Amplificación del producto de PCR *pilA*/Km^R. Carril MPM: marcador de peso molecular de 1 kb, carril 1 y 2: amplificación del producto PCR *pilA*/Km^R, C-: control negativo.

IX. 7.- Funcionalidad de la herramienta (pKD46ΩTc^R) generando la mutación del gen *pilA* de *Klebsiella pneumoniae*

Una vez obtenido el plásmido pKD46ΩTc^R para generar la mutación en el gen *pilA* en *K. pneumoniae* en las cepas 003 y ATCC13883, se procedió a hacer células electrocompetentes de dichas cepas bacteriana para luego electroporar el plásmido pKD46ΩTc^R y así poder expresar el sistema lambda red en ellas. Sin embargo, al realizar la transformación y seleccionarlas en tetraciclina, siempre obtuvimos colonias tanto en las cepas 003 y ATCC13883, como en los controles positivo y negativo (Figura 28), creando conflicto pues el control negativo no debería crecer en tetraciclina. Esto dificultó la selección de las cepas que pudieran estar adquiriendo el cassete de tetraciclina por la transformación. A pesar de ello, nos dimos a la tarea de amplificar por PCR en colonia y a extraer plásmido de varias clonas sin obtener resultados positivos. Por lo que se decidió realizar una CMI de las cepas 003 y ATCC13883 con tetraciclina desde 10, 15, 20, 25, 30 y 35 μg/μl. Observando que había crecimiento en 10, 15, 20, 25 y 30 μg/μl y en 35 μg/μl le costaba crecer, por lo que se decidió trabajar a esa concentración.

Por otro lado observamos que se tenían poblaciones sensibles y resistentes a tetraciclina dentro de las cepas a trabajar, algo que no observamos en un principio cuando decidimos utilizar dicho cassete de selección. Se aislaron clonas sensibles a tetraciclina dando pases picando las colonias tanto en placas con ampicilina como en tetraciclina. Al final se eligió una posible colonia sensible a tetraciclina de ambas cepas 003 y ATCC13883. Pero al momento de hacer la electroporación y plaquear se siguió observando que ambas cepas crecían en tetraciclina. Se decidió subir la concentración de la tetraciclina hasta 50 μg/μl para seleccionar, pero aun así se siguió observando el crecimiento de ambas cepas en tetraciclina (Figura 29). Por lo cual se llegó a la conclusión que posiblemente ambas cepas estaban expresando bombas de expulsión que le dan la resistencia a tetraciclina. Para comprobar esto, se realizó una PCR para amplificar lo genes *tetA* y *tetB* que confieren resistencia a tetraciclina por el mecanismo de bombas de expulsión. Los oligonucleótidos fueron proporcionados por el laboratorio LMHyC y el resultado que se obtuvo fue positivo para ambas cepas ya que se observó amplificación de ambos genes, se obtuvo el amplificado del gen *tetA* de 937 pb y se obtuvo el amplificado de *tetB* de 659 pb (Figura 30).

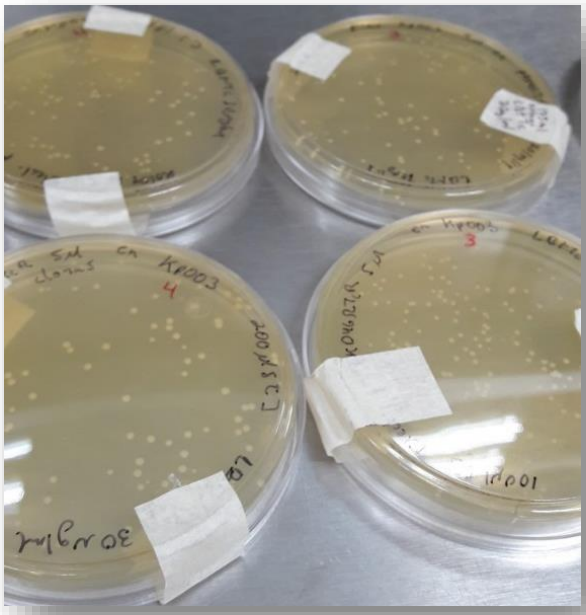


Figura 28. Se observan colonias después de la electroporación en las cepas 003 y ATCC13883, así como en el control positivo y negativo.

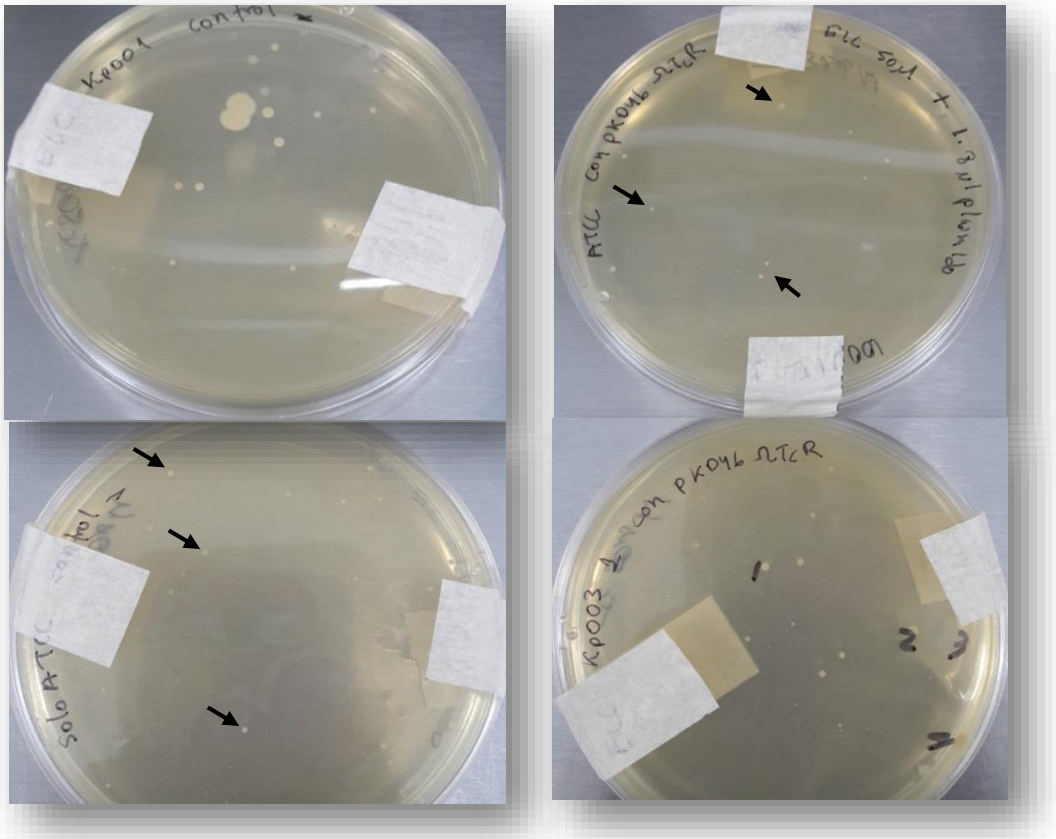


Figura 29. Se observan colonias después de la electroporación en las cepas 003 y ATCC13883, así como en el control positivo y negativo en placas LB+ tetraciclina a una concentración de 50 µg/µl.

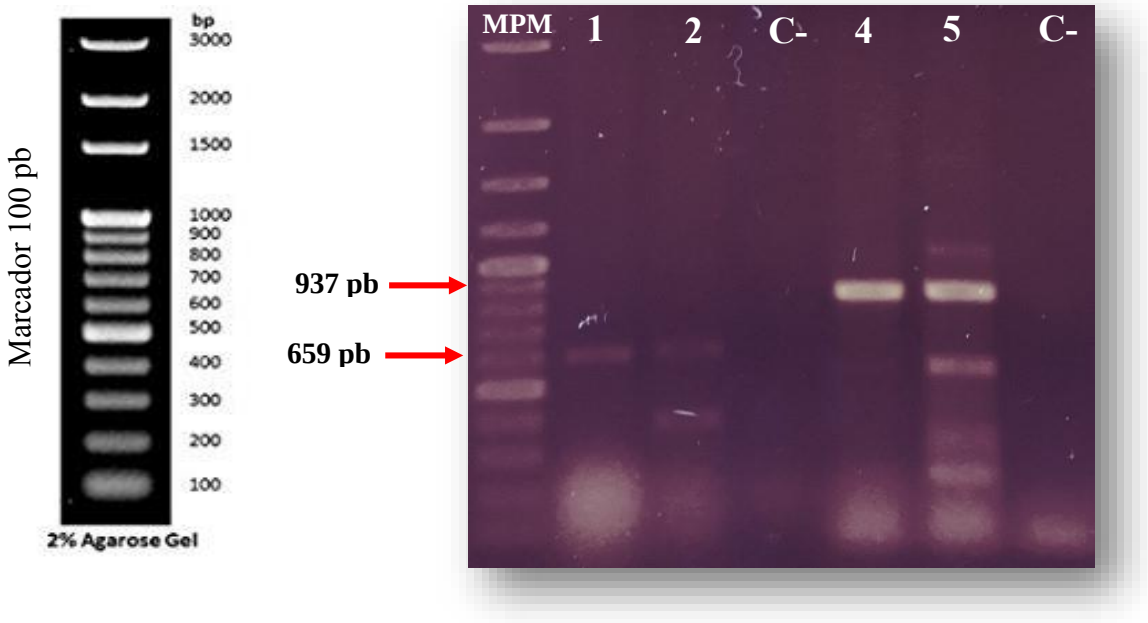


Figura 30. Amplificación por PCR de los genes *tetA* y *tetB*. Carril MPM: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1: cepa 003 y carril 2: cepa ATCC13883 amplificados de *tetB* de 659 pb, C-: control negativo, carril 4: cepa 003 y carril 5: cepa ATCC13883 amplificados de *tetA* de 937 pb, C-: control negativo.

IX. 8-.Amplificación por PCR del gen *catA1* (cloranfenicol) en las cepas 003 y ATCC13883

Ya que no existe una manera de seleccionar debido a que las cepas de *K. pneumoniae* están creciendo en tetraciclina. Se recomendó una nueva clonación en el plásmido pKD46 con otro cassete de resistencia para poder hacer la selección de las cepas que ya tienen el plásmido. Se propuso un cassete de resistencia a cloranfenicol, por lo cual se sembró las cepas 003 y ATCC13883 en cloranfenicol a una concentración de 20 µg/µl. Se observó crecimiento en la cepa 003 y en la cepa ATCC13883 no se observó crecimiento pero se observó un fenotipo raro como restos de polisacáridos (Figura 31). Además se hizo PCR para amplificar el gen *catA1* que confiere resistencia a cloranfenicol, se esperaba una banda de 630 pb, pero se observaron tres bandas en la cepa 003 una banda muy específica que corresponde a un tamaño

aproximado de 400 pb, una que corresponde al tamaño de aproximadamente 700 pb y la última banda que corresponde a un tamaño aproximado de 900 pb (Figura 32). En la cepa

ATCC13883 no se observó ningún amplificado al igual que en nuestro control negativo. Por lo que se concluye que este cassete de resistencia no se podría utilizar como selección.

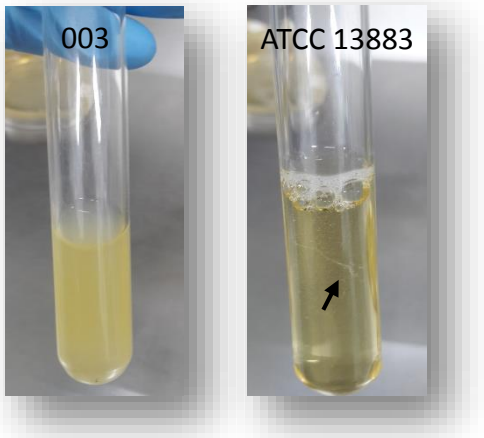


Figura 31. Crecimiento de las cepas 003 y ATCC 13883 en cloranfenicol. Se observó crecimiento en la cepa 003 y en la cepa ATCC13883 no se observó crecimiento pero se observó un fenotipo raro como restos de polisacáridos (flecha negra).

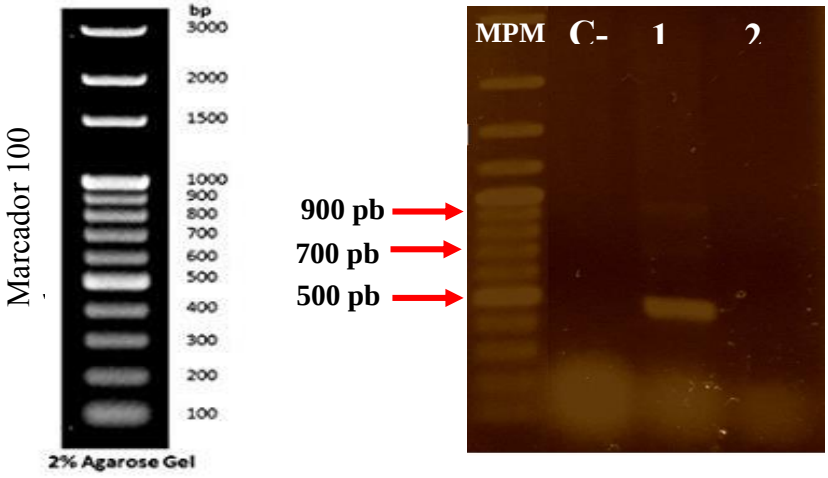


Figura 32. Amplificación por PCR del gen *catA1*. Carril MPM: marcador de peso molecular de 100 pb, C-: control negativo, carril 1: cepa 003 se observan tres bandas, una banda marcada que corresponde a un tamaño aproximado de 500 pb, una banda tenue que corresponde al tamaño de aproximadamente 700 pb y la última banda que corresponde a un tamaño aproximado de 900 pb.

X.- DISCUSIÓN

K. pneumoniae es una de las principales bacterias Gram negativas en causar infecciones adquiridas en el hospital y está asociada con una alta tasa de mortalidad. Además es cada vez más evidente que se aíslen cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, por lo cual la propagación relativamente rápida de este fenotipo de resistencia ha dificultado el tratamiento y el manejo de este tipo de infecciones (Clegg and Murphy, 2016).

Por otro lado, no se sabe mucho sobre su esquema patogénico más allá del papel de la cápsula. En el paradigma establecido de la patogénesis de *K. pneumoniae,* la cápsula de polisacárido antifagocítico es la característica más distintiva y el factor de virulencia más estudiado (Podschun and Ullmann, 1998). Solo se han propuesto y estudiado algunos otros factores, incluidos LPS y pili, como factores de virulencia, pero su contribución a la patogénesis del huésped no se ha examinado en detalle (Alcántar *et. al,* 2015).

Por lo tanto, es importante investigar con detalle a esta bacteria, ya que recientemente un resultado muy interesante que surgió, es que a pesar de que *K. pneumoniae* es considerada como una bacteria no móvil en el Laboratorio LMHyC se han reportado cepas cuya movilidad esta conferida por la presencia de un flagelo polar, siendo este el primer reporte sobre movilidad en esta bacteria (Carabarin *et. al,* 2016). Además, en experimentos de microscopía electrónica también fue destacada la presencia de otro apéndice filamentoso cuyas características lo asemejan a un pili tipo IV, seguido a esto se amplifico el gen que codifica para la pilina (*pilA*) del pili tipo IV en 26 cepas, así como se observó la expresión del gen *pilA* en condiciones de movilidad *twitching*, por PCR cuantitativa en tiempo real.

Primeramente, para comprobar que se trabajó con cepas de *K. pneumoniae*, se realizaron pruebas bioquímicas así como la amplificación del gen *shv* que codifica para una betalactamasa que esta intrínsecamente codificada en *K. pneumoniae* en ambas cepas de trabajo, la cepa 003 y ATCC13883.

El resultado de la mayoría de las pruebas bioquímicas en la cepa 003 nos indicó que tenemos una cepa *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, excepto en la prueba de Movilidad la cual dio positivo ya que *K. pneumoniae* está reportada como inmóvil (Brisse *et. al,* 2006), pero esto coincide con nuestros antecedentes donde reportan esta cepa como móvil (Carabarin *et. al,*

2016). Para la cepa ATCC13883 el resultado el resultado de las pruebas bioquímicas nos indicó que tenemos una cepa *K. pneumoniae*, subsp. *pneumoniae*, sin embargo la prueba bioquímica de Indol es dudosa ya que aparte de observar un anillo amarillo en la superficie, se observa uno color rojo lo que podría indicar Indol + (Hansen *et. al*. 2004; Alves *et. al*, 2006). Por lo tanto es importante complementar esta metodología con técnicas de identificación moleculares como la amplificación del gen *16s* de rRNA, así como el gen *rpoB* para confirmar su identidad. Ya que como antecedente para la cepa 003 esta identificación genotípica fue hecha dando como resultado un 98% de similitud con *Klebsiella pneumoniae* usando el gen *16s* de rRNA y 99% de similitud con *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* usando el gen *rpoB* (Carabariín *et. al*, 2016).

Con respecto al resultado que se obtuvo de la PCR amplificando el gen *shv*, la cepa 003 amplifico el fragmento esperado de 231 pb, mientras que la cepa ATCC13883, presentó bandas inespecíficas de las cuales ninguna corresponde al fragmento de 231 pb. Analizando los oligonucleótidos utilizado para amplificar *shv* en la plataforma betalactamase database, encontramos que éstos fueron diseñados universalmente para reconocer hasta 219 diferentes tipos de betalactamasas e incluso de otros organismos. Solo se puede saber a qué betalactamasa pertenece el amplificado en la cepa 003 mandándolo a secuenciar, mientras que para la cepa ATCC 13883 se necesitan otros oligos para reconocer y amplificar alguna otra betalactamasa SHV. De acuerdo a lo observado en el gel, una de las bandas amplificadas corresponde a un tamaño de aproximadamente de 800 pb y revisando en lo reportado (Pattanaik *et. al,* 2009; Compain *et. al,* 2014) en el NCBI de las betalactamasas en *K. pneumoniae* está tal vez podría corresponder a algunas betalactamasas con un tamaño de 861 pb que entes ellas se encuentran SHV-12, clase A SHV-1, SHV-11 y blaSHV2A betalactamasa de espectro extendido SHV-2. Se sabe que la familia SHV se ha derivado de *Klebsiella* spp. SHV-1 se encuentra universalmente en *K. pneumoniae*, evolucionó como un gen cromosómico en *Klebsiella* spp., y luego se incorporó a un plásmido, que se ha extendido a otras especies enterobacterianas. Un total de 40 tipos de SHV ya se ha informado (Jain and Mondal, 2008), esto se debe a cuando se producen sustituciones de uno a cinco aminoácidos en el gen estructural. Un estudio de Corea reveló que SHV es la betalactamasa de espectro extendido más común encontrada en Corea (Kim *et. al,* 1998). SHV (especialmente SHV-5) se encuentra comúnmente y se informa en todo el mundo (Jain and

Mondal, 2007), al igual que en India, la frecuencia reportada de SHV-5 en *Klebsiella* spp. fue entre 6% y 87% (Mathur *et. al,* 2005).

Por otro lado, el pili tipo IV no se ha descrito en esta bacteria. En el presente trabajo se intentó hacer la mutación en el gen *pilA* del pili tipo IV en *K. pneumoniae* tanto en una cepa de aislado clínico 003 y una cepa de referencia ATCC13883. La metodología por la cual se decidió hacer la mutación fue por el sistema lambda red. Esta metodología consiste en reemplazar una secuencia cromosómica específica con un gen de resistencia a antibióticos seleccionable flanqueado por brazos homólogos al gen a deletar (Yang, *et. al,* 2014). Sin embargo a pesar de que esta técnica de mutación se ha aplicado con éxito a *E. coli*, para aplicarla en otras bacterias, con frecuencia se requieren adaptaciones. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* los genes se pueden interrumpir mediante transformación con fragmentos de PCR que codifican un marcador seleccionable y que solo tengan 35 nt de ADN flanqueante homólogo al cromosoma (Baudin *et. al,* 1993). En *Candida albicans* la interrupción dirigida de genes cromosómicos se puede hacer mediante el uso de fragmentos de PCR similares con extensiones de homología de 50 a 60 nt (Wilson *et. al,* 1999). En *Yersinia pseudotuberculosis,* las extensiones de homología de aproximadamente 500 nt generadas mediante un procedimiento de PCR de 3 pasos, podrían desencadenar una interrupción genética reproducible (Derbise *et. al,* 2003). En *P. aeruginosa*, en la que se generaron deleciones de un solo gen cromosómico utilizando un producto de PCR de 3 pasos que contiene regiones flanqueantes de 600 a 400 nt que son homólogas a la secuencia objetivo (Lesic and Rahme, 2008). Para la mutación del gen *pilA* en cepas de *K. pneumoniae* se mandaron a sintetizar oligos mutagenicos que son en total de 60 pb, 40 pb corresponde al gen objetivo (*pilA*) y 20 pb corresponde al cassete de resistencia a tetraciclina (Figura 21).

En un estudio de Wei y colaboradores (Wei *et. al,* 2012) analizaron las longitudes de las extensiones homólogas al gen a deletar, eligiendo de 39 a 663 nt, encontrando que la relación de recombinación se correlacionó estrechamente con la longitud de las extensiones homólogas. El fragmento de ADN de extensión homólogo de 478 y 663 nt dio la relación de recombinación más alta de 267 CFU / μg de ADN. Las proporciones de recombinación disminuyen bruscamente cuando se aplican fragmentos de ADN más cortos, y no se obtiene ningún transformante cuando se usaron fragmentos de ADN con extensión homóloga de 116

nt o menos. Aquí es importante mencionar que en un estudio de Huang y colaboradores (Huang *et. al,* 2014) para la deleción del operón de síntesis de polisacáridos capsulares en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 también se presentaron con un problema similar. Examinaron cómo las diferentes longitudes de homología afectan la eficiencia de la transformación al eliminar el mismo locus en *K. pneumoniae* usando cassetes que contenían homología de 39 pb, 60 pb y 700 pb en la región objetivo. Recuperaron 26, 46 y 255 transformantes utilizando las longitudes de homología de 39 pb, 60 pb y 700 pb, lo que resultó en eficiencias de transformación de 1.3×10^{-8}, 2.5×10^{-8} y 1.1×10^{-7}, respectivamente. Al final ellos concluyen que a pesar de ver resultados con oligosde una homología más larga, el uso de cassetes con brazos de homología más largos requeriría un paso de clonación adicional. Por lo tanto ellos escogieron realizar la mutación con oligosque tienen solo 80–85 nucleótidos de largo, es decir con 60 pb de homología al gen objetivo y de 20 a 25 nucleótidos del cassete (Huang *et. al,* 2014). Cabe mencionar que los oligos mutagenicos que se mandaron a sintetizar para la mutación en el gen *pilA* son en total de 60 pb, pero al querer hacer la deleción del gen de solo 440 pb, hay una mayor probabilidad que se obtenga la recombinación ya que como se ha discutido para poder hacer mutaciones en genes de *K. pneumoniae* se deben tener tamaños de oligos mutagenicos más largos si el gen a deletar es de un tamaño más largo, esto se podría comprobar en estudios posteriores.

Otras adaptaciones que se han realizado para hacer mutaciones en *Klebsiella pneumoniae* son las realizadas por Wei y colaboradores (Wei *et. al,* 2012) donde utilizaron el sistema lambda red para realizar una deleción del gen *dhak1* que codifica una subunidad de la enzima dihidroxiacetona quinasa II. Ellos analizaron diferentes parámetros entre ellos la concentración de IPTG para inducir el sistema lambda red, encontrando que la relación de recombinación máxima se obtiene a 0,8 mM de IPTG (266,8 UFC / μg de ADN). Curiosamente, las concentraciones más altas de IPTG reducen significativamente la relación de recombinación.

Es importante mencionar que para hacer la mutación del gen *pilA* en el presente trabajo, por medio del sistema lambda red, se utilizó el plásmido pKD46, el cual produce un número mayor de recombinantes (Datsenko and Wanner B. 2000). Pero esté plásmido al tener un cassete de resistencia a ampicilina y siendo *K. pneumoniae* intrínsecamente resistente a

ampicilina, se tuvo que adecuar dicho plásmido Buscando diferentes estrategias la que se obtuvo con éxito fue la linearización del plásmido pKD46 con la enzima *XmnI* para después clonar un cassete de resistencia a tetraciclina obteniendo al vector pKD46ΩTc^R. Esta estrategia ya se ha realizado con anterioridad. En un estudio de Doublet y colaboradores (Doublet *et. al,* 2008) para hacer la mutación de una isla genómica (SGI1) en una cepa de *S. typhimurium* multirresistente utilizan también el plásmido pKD46 linearizado con la enzima *XmnI* para después clonar un cassete de resistencia a gentamicina obteniendo con éxito la mutante.

En el presente trabajo una vez obtenida la construcción pKD46ΩTc^R basándonos en la técnica de Huang y colaboradores de una descripción general del protocolo basado en el sistema lambda red para crear genes knockouts en *Klebsiella pneumoniae* (Huang *et. al,* 2014) se hicieron electrocompetentes de las cepas de *K. pneumoniae* 003 y ATTC13883 para poder transformar por electroporación este plásmido. Sin embargo todas las cepas crecieron en tetraciclina incluyendo las células electrocompetentes, por lo cual ya no hubo manera de seleccionar. En nuestros resultados encontramos que estas dos cepas de *K. pneumoniae* estan expresando dos bombas de flujo para expulsar la tetraciclina usada como selección. Es cada vez más evidente que existe un reservorio de genes que se intercambian y ensamblan para crear cepas con un potencial infeccioso y resistente a los antibióticos, esto agregando a que existen diversos mecanismos por los cuales la bacteria puede ser resistente (Broberg *et. al,* 2014). Uno de los mecanismos más importantes, considerado uno de los principales contribuyentes a la aparición de agentes patógenos MDR, es el flujo de antibióticos que se consigue con las bombas de flujo, estas bombas son proteínas ubicadas en la membrana interna de las bacterias Gram-negativas y en la membrana citoplasmática de las bacterias Gram-positivas. En *K. pneumoniae* se ha visto que se expresan bombas de flujo dando resistencia ciprofloxacina, tetraciclina, ceftazidima y gentamicina (Padilla *et. al,* 2010).

Al no tener una manera de seleccionar nuestras células transformantes una alternativa para poder hacer la selección de las cepas es realizar otra construcción pero con otro cassete de resistencia. Por lo cual se debe hacer un análisis exhaustivo para conocer a que antibióticos son sensibles estas cepas para poder hacer la selección con esta técnica de mutación. Es importante mencionar que una alternativa sería hacerlo con otro plásmido que también

codifique el sistema lambda red como el trabajo hecho por Huang y colaboradores (Huang *et. al*, 2014) donde utilizaron el plásmido pACBSR-Hyg, donde reemplazan un cassete de resistencia a cloranfenicol por un cassete de resistencia a higromicina, ya que no hay reportes de *Klebsiella pneumoniae* con resistencia a este antibiótico, pero es importante primero hacer el estudio de resistencia de higromicina es nuestras cepas de estudio.

Uno de los problemas cuando se trabaja con cepas de *Klebsiella* es la resistencia a múltiples fármacos de estos organismos, lo que limita el número de cassetes de resistencia que pueden emplearse en el laboratorio para mutagenizar genes bacterianos (Alcántar *et. al*, 2015). Está claro que resulta difícil elegir un cassete de resistencia para poder clonarlo en el plásmido pKD46 (sistema lambda red) para así seleccionar las cepas de *K. pneumoniae* que contengan el plásmido una vez que se introduce por medio de electroporación. Por lo que se propone que se deben buscar otras alternativas de mutación al sistema lambda red para poder hacer la mutación en el gen *pilA* de las cepas de *K. pneumoniae*, y así saber qué papel desempeña el pili tipo IV en *K. pneumoniae*. Una de las técnicas más clásicas sería hacerlo por medio de vectores suicidas, ya que otras técnicas con éxito todavía no están reportadas para generar mutaciones en la bacteria *K. pneumoniae*, sin embargo siempre existe el problema de usar un cassete de resistencia para la selección de mutantes.

XI.- CONCLUSIONES

Se obtuvo la construcción del plásmido pKD46ΩTc^{R} (herramienta de mutagenesis lambda red).

Se obtuvo el producto de PCR *pilA*/Km^{R} para la mutación por el sistema lambda red en el gen *pilA.*

XII.- PERSPECTIVAS

Seguir intentando obtener la mutación en el gen *pilA* en las cepa *K. pneumoniae* 003 y la cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 por el sistema lambda red (pKD46ΩTc^{R}) utilizando inhibidores de bombas de tal manera que no se exprese la resistencia de las cepas de *K. pneumoniae* a tetraciclina.

Realizar la mutación en el gen *pilA* en las cepas 003 y ATCC 13883 por el sistema lambda red, pero adecuando el sistema con otro cassete de resistencia para seleccionar.

Realizar la mutación en el gen *pilA* en las cepas 003 y ATCC 13883 por medio de vectores suicidas

Realizar fenotipos de *movilidad twitching* en las cepas silvestres así como mutantes 003 y ATCC 13883.

Observar el pili tipo IV en las cepas silvestres así como mutantes 003 y ATCC 13883 por microscopía electrónica.

XIII.-ANEXOS

Medio SOC (super optimal broth plus glucose)

Peptona de caseína 2g ---------- 100 ml

Extracto de Levadura 0.5g--------100 ml

NaCl ----------10 mM

$MgSO_4$ ----------10 mM

$MgCl_2$----------10 mM

KCl ----------2.5 mM

Glucosa ----------20 mM

Se debe agregar en solución la Glucosa, $MgCl_2$ y $MgSO_4$. Ajustar el pH a 7 con NaOH 1M y esterilizar a 5lb por 30 min

Extracción Plasmídica (QUICK PREP)

Se obtiene el paquete celular de 10- 15 ml de cultivo (en este medio principalmente para plásmidos de bajo número de copias) (con correspondiente antibiótico si requiere) por medio de centrifugación todo el cultivo a 3 minutos a 13000 rpm para la obtención de la pastilla, se decanta el sobrenadante y una vez que se ha terminado de centrifugar todo el cultivo quitarle el resto del medio con una punta. Se agrega 252 µl de solución 1, 0.0003 g de lisozima y 3µl de RNasa (realizar mezcla para un tubo mas siempre). Se incuba estático a 37ºC durante 20 minutos, se agrega 400 µl de solución 2 (mezcla 50:50 de NaOH .4N y SDS 2%), se invierte 5 veces, se coloca 5 minutos en hielo, se agrega 520µl de solución 3 Acetato de potasio (CH_3CO_2K 2.7M pH 5.4) se invierte 3 veces hasta el fondo, se mantiene 15 minutos en hielo, se centrifuga 40 min a 13000 rpm, en este tiempo se preparan los tubos correspondientes con 400 µl (200 µl de fenol- 200µl de cloroformo) (usando micropipeta) (se deben agitar antes y se deben mantener fríos) para decantar el sobrenadante, el cual después se invierte

lentamente 100 veces, se centrifuga 12 minutos a 13000 rpm, se transfiere el sobrenadante (con micropipeta lentamente dejando un espacio entre fases) a 400 µl de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), se invierte 50 veces (lentamente), nuevamente se centrifuga a 1300 rpm (si se ve muy sucia la muestra se debe repetir este paso), se transfiere el sobrenadante (con micropipeta) a un tubo nuevo y se agrega etanol absoluto hasta completar el volumen del tubo de 1. 5 ml, después se invierte como unas 12 veces y en este paso se puede dividir la técnica o se deja en el ultracongelador de – 72°C por 30 minutos y se sigue con los siguientes pasos o se mantiene toda la noche a -20ºC, para luego posteriormente volver a centrifugar 25 minutos 13000 rpm, decantar (cuidado de no perder la pastilla) y agregar 800 µl de Etanol al 70% se debe invertir el tubo como unas 12 veces, centrifugar 12 minutos 12000 rpm, repetir este último paso, para finalmente decantar y secar boca abajo en una sanita por 10 min (cuidado de no perder la pastilla) poner a secar los tubos abiertos en el termoblog previamente ajustado a 37°C por 15 min, una vez que vimos que se secó completamente el tubo se debe resuspender nuestra pastilla en 35 ul de agua TDE filtrada estéril o buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0).Al finalizar se debe correr las muestras en una cámara de electroforesis cargando el 10 % de la muestra para comprobar si salió la extracción (Sambrook and Russell, 2001).

Extracción Plasmídica (QUICK PREP) para las cepas de *K. pneumoniae*

Esta técnica es igual a la descrita anteriormente solo se le agrega un paso importante el cual consiste en que una vez que se obtiene el paquete celular y se le quita el resto del medio con pipeta y punta, se debe dar dos lavados con 1 ml de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) buffer, pH 8.0) pipeteando hasta disolver la pastilla y posteriormente se debe centrifugar por 5 min a 13 000 rpm y luego continuar con la técnica normalmente (modificado de Sambrook *et. al*, 1989).

Solución 1:

EDTA 0.5M, TRIS 2M, Sacarosa 30g, H2O TDE. Aforar a 200ml y esterilizar por filtración, almacenar a 4ºC.

Solución 2:

Mezcla 50:50 de NaOH 0.4N (almacenar a 4ºC) y SDS 2%, (almacenar a temperatura ambiente).

Solución 3:

Acetato de Potasio (CH3CO2K) 2.7M pH 5.7 (ajustar pH con Ácido Acético Glaciar aproximadamente 50 ml), esterilizar a 15 Lb/121°C por 15 minutos. Almacenar a 4ºC.

Buffer TE:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0, esterilizar a 15 Lb/121°C por 15 minutos. Almacenar a 4 ºC.

Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)

Para 25 ml: con una probeta medir 24 ml de cloroformo puro y agregar 1 ml de alcohol isoamílico. Almacenar a 4 ºC.

Etanol al 70%

Para 50 ml: con una probeta medir 35 ml de etanol y agregar 15 ml de agua bidestilada estéril. Almacenar a 4 ºC.

Solución de lisozima 3 mg/ml

Para 1 ml: Pesar 0.003 g de lisozima en un tubo eppendorf estéril, agregar solución 1 (depende de cuantos tubos se va hacer de extracción ya que son 252 µl de la solución 1 por tubo) y homogenizar con vórtex.

Fenol puro en buffer Tris-HCl pH 8.0

Para 100 ml: Descongelar el fenol en baño María a 65ºC, tomar 100 ml y colocarlo en frasco ámbar, agregar 100 ml de agua bidestilada estéril, colocar un agitar magnético y agitar por 2 horas, dejar que se separe la fase orgánica de la fase acuosa, retirar el agua y agregar 100 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 estéril, agitar por 2 horas, dejar que se separen las fases, retirar el buffer y agregar buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 estéril, agitar por 2 horas, almacenar a 4ºC (no retirar el buffer).

Solución de $Cacl_2$ 0.2 M

Para 90 ml: (de preferencia preparar el mismo día). Pesar 2.64 g, disolver con agua TDE estéril, esterilizar a 15 Lb/121°C por 15 minutos. Almacenar a 4 ºC.

TAE 50X:

TRIS base ---------- 242g

EDTA ---------- 37.2g

Ácido Acético Glaciar ---------- 57.1ml

H_2O TDE ---------- 600ml

Disolver el EDTA en los 600 ml de H2O TDE, una vez disuelto ir agregando poco a poco el TRIS base, ya disuelto agregar el Ácido Acético y ajustar pH a 8.3, aforar a 1L y esterilizar a 10 Lb durante 15 minutos.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- 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):129-38.
- Alexeyev M. F., Shokolenko I. N., Croughan T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*. 160(1):63-67.
- Alves M. S., Dias R. C., Dias de Castro A. C., Riley L. W. and Moreira B. M. (2006). Identification of Clinical Isolates of Indole-Positive and Indole-Negative *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 44 (10): 3640–3646.
- Arivett B. A., Ream D. C., Fiester S. E., Mende K., Murray C. K., Thompson M. G., Kanduru S., Summers A. M., Roth A. L., Zurawski D. V., Actis L. A. (2015). Draft Genome Sequences of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Type Strain ATCC 13883 and Three Multidrug-Resistant Clinical Isolates. *Genome Announc*. 15: 3(1).
- Babini G. S. and Livermore D. M. (2000). Are SHV β-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob. Agents Chemother*. 44:2230. doi: 10.1128/AAC.44.8.2230-2230.2000.
- Basaranoglu S. T., Ozsurekci Y., Aykac K., Karadag Oncel E., Bıcakcigil A., Sancak B., Cengiz A. B., Kara A., Ceyhan M.. (2017). A comparison of blood stream infections with extended spectrum beta-lactamase-producing and non-producing *Klebsiella pneumoniae* in pediatric patients. *Ital J Pediatr*. 43(1):79.
- Baudin A., Ozier-Kalogeropoulos O., Denouel A., Lacroute F., Cullin C. (1993). *Nucleic Acids Res.* 21:3329–3330.
- Bergeron J. R. C. and Sgourakis N. G. (2015). Type IV Pilus: One Architectural Problem, Many Structural Solutions. *Cell Press* (23):253- 255.
- Bi D., Jiang X., Sheng Z. K., Ngmenterebo D., Tai C., Wang M., Deng Z., Rajakumar K., Ou H. Y. (2015). Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a "resistance-disarmed" model organism. *J. Antimicrob. Chemother*. 70(10): 2770–2774.
- Boyer H. W., Roulland-Dussoix D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli. J Mol Biol.* 41(3):459-72.
- Boyle D., P. and Zembower T., R. (2015). Epidemiology and management of emerging drug-resistant Gram-negative bacteria: extended-spectrum beta-lactamases and beyond. *Urol Clin* 42:493–505.
- Bradford P. A., Bratu S. Urban C., Visalli M., Mariano N., Landman D., Rahal J. J., Brooks S., Cebular S., Quale J. (2004). Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 39:55–60.
- Brisse S., Verhoef J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:915–924.
- Brisse S., Grimont F., Grimont P.A. D. (2006). The Genus *Klebsiella*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY.
- Broberg C. A., Palacios M. and Miller V. L. (2014). *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep*; 6: 64.
- Bush K., and Jacoby G. A. (2010). Updated functional classification of b-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 54: 969–976.

- Capone A., Giannella M., Fortini D., Giordano A., Meledandi M., Ballardini M., Venditti M., Bordi E., Capozzi D., Balice M. P., Tarasi A., Parisi G., Lappa A., Carattoli A., Petrosillo N. (2013). High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect*. 19:23-30.
- Carabarin A., León L., Rocha R., Castañeda M., Torres C., Gutiérrez Z., González S., Martínez C., Martínez Y. and Lozano P. (2016). First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of Medical Microbiology*. 65: 729-737.
- Carter D. M., Radding C. M. (1971). Role of exonuclease and β protein of phage lambda in genetic recombination. II. Substrate specificity and the mode of action of lambda exonuclease. *J Biol Chem*. 246:2502–2510.
- Casewell M., and Phillips I. (1977). Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. *Br Med J, 2*(6098): 1315-1317.
- Chang Y., Rettberg L., Treuner A., Iwasa J., Sogaard L. and Jensen J. (2016). Architecture of type IV pilus machine. *Science*. 351: 1165-1171.
- Cheng H.Y., Chen Y. S., Wu C.Y., Chang H.Y., Lai Y.C., Peng H. L., (2010). RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Bacteriol* 192:3144–3158.
- Chung The H., Karkey A., Thanh D. P., Boinett C. J., Cain A. K., Ellington M., Baker K. S., Dongol S., Thompson C., Harris S. R., Jombart T., Thi Phuong T. L., Do Hoang N. T., Thanh T. H., Shretha S., Joshi S., Basnyat B., Thwaites G., Thomson N. R., Rabaa M. A., Baker S. (2015). A high-resolution genomic analysis of multidrugresistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae. EMBO Mol Med*. 7:227-239.
- Clegg S. and Murphy C. N. (2016). Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 435-457.
- Compain F., Frangeul L., Drieux L., Verdet C., Brisse S., Arlet G., Decré D.(2014). Complete nucleotide sequence of two multidrug-resistant IncR plasmids from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(7):4207-10.
- Cortes G., Borrell N., de Astorza B., Gomez C., Sauleda J., Alberti S. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun* 70:2583–2590.
- Craig L., Volkmann N., Arvai S., Pique M., Yeager M., Egelman E. and Tainer J. (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystalography: implications for pilus assembly and functions. *Molecular Cell*. 23: 651-662.
- Craig L., Forest K. T. and Maier, B. (2019) Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nat Rev Microbiol* 17: 429–440.
- Cristina M.L., Sartini M., Ottria G., Schinca E., Cenderello N., Crisalli M.P., Fabbri P., Lo Pinto G., Usiglio D., Spagnolo A.M. (2016). Epidemiology and biomolecular characterization of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* in an Italian hospital. J *Prev Med Hyg.* 57(3): 149–156.
- Datsenko K. A. and Wanner B. L. (2000).One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97 12: 6640–6645.
- Derbise A., Lesic B., Dacheux D., Ghigo J. M., Carniel E. (2003). A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 38:113–116.
- Di Martino P., Livrelli, V., Sirot D., Joly B., Darfeuille-Michaud A. (1996). A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and immunity*, 64(6): 2266-2273.

- Docquier J. D., Riccio M. L., Mugnaioli C., Luzzaro F., Endimiani A., Toniolo A., Amicosante G., Rossolini G. M. (2003). IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-b-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. 47: 1522–1528.
- Doorduijn D. J., Rooijakkers S. H. M., Schaik W. V., Bardoel B. W. (2016).Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology* 221: 1102–1109.
- Doublet B., Douard G., Targant H., Meunier D., Madec J.Y., Cloeckaert A. (2008). Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J Microbiol Methods.* 75 (2):359-61.
- Echeverri L. M. and Cataño J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: Epidemiology and drug resistance. *Iatreia* 23(3):240-249.
- Ellison C. K., Kan J., Dillard R. S., Kysela D. T., Ducret A., Berne, C., Hampton C. M., Ke Z., Wright E. R., Biais N., Dalia A. B., Brun Y. V. (2017). Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing. *Science* 358, 535–538.
- Fang C. T., Lai S. Y., Yi W. C., Hsueh P. R., Liu K. L. and Chang S. C. (2007). *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin. Infect. Dis*. 45(3): 284–293.
- Fevre C., Passet V., Weill F. X., Grimont P. A., Brisse S. (2005). Variants of the *Klebsiella* pneumoniae OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(12): 5149-5152.
- 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.
- Friedländer C. (1882). Uber die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 87:319–324.
- Gao L. R., Jiang X., Fu S. L., Gong H. (2014). In silico identification of potential virulence genes in 1, 3-propanediol producer *Klebsiella pneumoniae*. *J Biotechnol* 189:9–14.
- Giltner C. L, Nguyen Y. and Burrows L. L. (2012). Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012 Dec; 76(4): 740–772.
- Granata G. and Petrosillo N. (2017). Resistance to Colistin in *Klebsiella Pneumoniae*: A 4.0 Strain? *Infect Dis Rep*. 9(2): 69- 72.
- Gonzalez A. K. and Forest K. T. (2017). Shearing and enrichment of extracellular Type IV pili. *Methods Mol Biol*. 1615: 311–320.
- Gust B., Challis G. L., Fowler K., Kieser T., Chater K. F. (2003) PCR targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci* USA 100(4):1541- 1546.
- Guzman L. M., Belin D., Carson M. J., Beckwith J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose ^{P}BAD promoter. *J Bacteriol* 177:4121–4130.
- Hansen D. S., Mestre F., Alberti S., Hernández-Allés S., Alvarez D., Doménech-Sánchez A., Gil J., Merino S., Tomás J. M., Benedí V. J. (1999). *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J Clin Microbiol* 37(1):56-62.
- Hansen D. S., Aucken H. M., Abiola T. and Podschun R. (2004) Recommended test panel for differentiation of Klebsiella species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *J Clin Microbiol.* 42(8):3665- 3669.
- Hansen J.K. and Forest K.T. (2006). Type IV Pilin Structures: Insights on Shared Architecture, Fiber Assembly, Receptor Binding and Type II Secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 11:192–207.

- Hartung S., Arvai A. S., Wood T., Kolappan S. David S. Shin D. S., Craig L. and John A. Tainer J. A. (2011). Ultrahigh Resolution and Full-length Pilin Structures with Insights for Filament Assembly, Pathogenic Functions, and Vaccine Potential. *J Biol Chem*. 286(51): 44254–44265.
- Hashimoto-Gotoh T., Franklin F. C., Nordheim A., Timmis K. N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors. I. Low copy number, temperature-sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene*. 16(1-3):227-35.
- Huang T. W., Lam I., Chang H. Y., Tsai S. F., Palsson B. O., Charusanti P. (2014). Capsule deletion via a λ-Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. *BMC Res. Notes*, 8:7–13.
- 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., Wilksc, J., Gorrie C., Schultz M. B., Edwards D. J., Nguyen K., Van Nguyen T. V., Dao T. T., Mensink M., Minh V., Le Nhu N. T. K., Schultsz C., Kuntaman K., Newton P. N., Moore C. E., Strugnell R. A., Thomson N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 112(27): 3574–3581.
- Horan T. D., Culver W., Jarvis G., Emori S., Banerjee W., Martone and C., Thornsberry. (1988). Pathogens causing nosocomial infections. *Antimicrobic Newsl.* 5:65–67.
- 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. *J. Infect. Dis.* 197: 1717–1727.
- 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.
- Hsu C. R., Lin T. L., Chen Y. C., Chou H. C., and Wang J. T. (2011). The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology* 157(12): 3446–3457.
- Jacoby G. A. (2009). AmpC b-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev*. 22:161–182.
- Jacob J. T., Klein E., Laxminarayan R., Beldavs Z., Lynfield R., Kallen A. J., Ricks P., Edwards J., Srinivasan A., Fridkin S., Rasheed J. K., Lonsway D., Bulens S., Herrera R., McDonald L. O., Patel J., Limbago B., Bell M., Cardo D., (2013). Vital signs: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *MMWR* Morb Mortal *Wkly Rep* 62:165–170.
- Jain A. and Mondal R. (2007). Prevalence and antimicrobial resistant pattern of extended spectrum β-lactamase producing *Klebsiella* spp. isolated from cases of neonatal septisaemia. *Indian J Med Res*. 125(1):89–94.
- Jain A. and Mondal, R. (2008). TEM & SHV genes in extended spectrum β-lactamase producing Klebsiella species & their antimicrobial resistance pattern. *Indian J Med Res*. *128*(6).
- Jarrell K. and McBride M. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature*. 6: 466-474.
- Jarvis W. R., Munn V. P., Highsmith A. K., Culver D. H., Hughes J. M. (1985). The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 6(2):68–74.
- Jayol A., Nordmann P., Brink A., and Poirel L. (2015). Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 2780–2784.
- Johnson D. I. (2018) In: Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors. *Cham: Springer*. (19):269-277.
- Jones R. N. (2010) Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis* 51:81–87.

- Kamal F., Williams G., Akbar H., Khan M. A. and Kadaria D. (2017). *Klebsiella Pneumoniae* Liver Abscess: a Case Report and Review of Literature. *Cureus* 9(1).
- Kamil C., Bennetta R. K., Fasta A. G., Papoutsakis E. T. (2018). Engineering *Clostridium* organisms as microbial cell-factories: challenges & opportunities. *Metabolic Engineering* 50:173-191.
- Katashkina J, Hara Y, Golubeva L, Andreeva I G., Kuvaeva T M., Mashko S. V. (2009) Use of the k Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. *BMC Mol Biol* 10(1):34.
- Kim J., Kwon H., Pai J. (1998). Survey of *K. pneumoniae* strains producing extended spectrum betalactamase: prevalence of SHV-12 and SHV-2 in Korea. *J Clin Microbiol*. 36:1446–1449.
- Lai Y. C., Peng H. L., Chang H. Y. (2003). RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *J Bacteriol* 185: 788–800.
- Lesic B. and Rahme L. G. (2008). Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Molecular Biology* 9:20.
- Li B., Zhao Y., Liu C., Chen Z., Zhou D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. 9(9):1071-1081.
- Limbago B. M., Rasheed J. K., Anderson K. F., Zhu W., Kitchel B., Watz N., Munro S., Gans H., Banaei N., Kallen A. J. (2011). IMP-producing carbapenem-*resistant Klebsiella pneumoniae* in the United States. *J. Clin. Microbiol*. 49: 4239–4245.
- Lin J., Zhang Y., Xu D., Xiang G., Jia Z., Fu S., Gong H. (2016). Deletion of poxB, pta, and ackA improves 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100:2775–2784.
- Lin W. H., Wang M. C., Tseng C. C., Ko W. C., Wu A. B., Zheng P. X. and Wu J. J. (2010). Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing community-acquired urinary tract infections. *Infección* 38: 459–464.
- Lopéz Reynoso C. I. (2019). Caracterización del pili tipo IV en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, Tesis de Maestía. CICM, ICUAP.
- Magill S. S., Edwards J. R., Bamberg W., Beldavs Z. G., Dumyati G., Kainer M. A., Lynfield R., Maloney M., McAllister-Hollod L., Nadle J., Ray S. M., Thompson D. L., Wilson L. E., Fridkin S. K. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. *N. Engl. J. Med.* 370:1198–1208.
- Martin R. M. and Bachman M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 8:4.
- Mathur P., Kapil A., Das B. (2005). Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing Gram-negative bacteria in a tertiary care hospital. *Indian J Med Res*. 115:153–157.
- Matsen J. M., Spindler J. A., Blosser R. O. (1974). Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, *28*(4): 672-678.
- Meatherall B. L., Gregson D., Ross T., Pitout J. D., Laupland K. B. (2009). Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am J Med* 122:866-873.
- Melville S. and Craig L. (2013). Type IV pili in Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 77: 323-341.
- Merino S., Camprubi S., Alberti S., Benedi V. J., Tomas J. M. (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun* 60:2529-2535.
- Mills J. P., Talati N. J., Alby K., Han J. H. (2016). The epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection among long-term acute care hospital residents. *Infect Cont Hosp Ep*. 37(1):55–60.

- Montgomerie, J. Z. (1979). Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev. Infect. Dis*. 1: 736–753.
- Muniyappa K., Radding C. M. (1986). The homologous recombination system of phage λ: pairing activities of β protein. *J Biol Chem*. 261:7472–7478.
- Murphy K. C. (1991). λ Gam protein inhibits the helicase and χ-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J Bacteriol*. 173:5808-5821.
- Murphy K. C. (1998). Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 180(8): 2063–2071.
- Murphy C. N. and Clegg S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol*. 7(8): 991–1002.
- Murphy C. N., Mortensen M. S., Krogfelt K. A., Clegg S. (2013). Role *of Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.* 81(8): 3009–3017.
- Muschiol S., Balaban M., Normark S., Henriques-Normark B. (2015). Uptake of extracellular DNA: competence induced pili in natural transformation of Streptococcus pneumoniae. Bioessays. 37 (4):426-35.
- Nordmann P., Naas T., Poirel L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 17: 1791–1798.
- Oelschlaeger T. A. and Tall B. D. (1997). Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect Immun* 65: 2950–2958.
- Ottow J. C. G. (1975) Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol* 29: 79–108.
- Paczosa M. K. and Mecsas J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:629–661.
- Padilla E., Llobet E., Doménech-Sánchez A., Martínez-Martínez L, José Antonio Bengoechea J. A., and Albertí S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(1): 177–183.
- Pan Y. J., Lin T. L., Chen Y. H., Hsu C. R., Hsieh P. F., Wu M. C., Wang J. T. (2013) Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by *wzc* Sequencing. *PLoS ONE* 8 (12): e80670.
- Pan Y. J., Lin T. L., Chen C. T., Chen Y. Y., Hsieh P. F., Hsu C. R., Wu M. C., Wang J. T. (2015). Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci. Rep*. 5:15573.
- Patel P. K., Russo T. A., Karchmer A. W. (2014). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Brief Report, Ofid*. 1-3.
- Pattanaik P., Bethel C. R., Hujer A. M., Hujer K. M., Distler A. M., Taracila M., Anderson V. E., Fritsche T. R., Jones R. N., Pagadala S.R., van den Akker F., Buynak J. D., Bonomo R. A. (2009). Strategic design of an effective beta-lactamase inhibitor: LN-1-255, a 6-alkylidene-2'-substituted penicillin sulfone. *J Biol Chem.* 284(2):945-53.
- Pelicic V. (2008). Type IV pili: e pluribus unum?. *Molecular Microbiology*. 68: 827-837.
- Peña C., Pujol M., Ardanuy C., Ricart A., Pallares R., Liñares J., Ariza J, Gudiol F. (2001). An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteriemia, including strains producing extended-spectrum beta-lactamase. *J Hosp Infec*, 47: 53-59.
- Piepenbrink K. H. (2019). DNA Uptake by Type IV Filaments *Front. Mol. Biosci.* 6:1.
- Podschun, R. and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, *11*(4): 589-603.

- Poulou A., Voulgari E., Vrioni G., Xidopoulos G., Pliagkos A., Chatzipantazi V., Markou F., Tsakris A. (2012). Imported *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clones in a Greek hospital: impact of infection control measures for restraining their dissemination. *J Clin Microbiol*. 50:2618–2623.
- Poirel L., Heritier C., Tolun V., Nordmann P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 48:15–22.
- Pournaras S., Ikonomidis A., Tzouvelekis L. S., Tokatlidou D., Spanakis N., Maniatis A. N., Nicholas J. L., Tsakris A. (2005). VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-b-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob. Agents Chemother*. 49: 5153–5156.
- Proft T. and Baker N. (2009). Pili in Gram-nagative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cellular and molecular life sciences*. 66: 613-635.
- Runcharoen C., Moradigaravand D., Blane B., Paksanont S., Thammachote J, Anun S., Parkhill J., Chantratita N. and Peacock S. J. (2017). Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumonia*. *Genome Med* 9(1) 6.
- Russo T. A., Shon A. S., Beanan J. M., Olson R., MacDonald U., Pomakov A. O., Visitacion M. P. (2011). Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than "classical" *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PLoS One* 6:e26734.
- Sahly H. and Podschun R. (1997). Clinical, Bacteriological, and Serological Aspects of *Klebsiella* Infections and Their Spondylarthropathic Sequelae. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, *4*(4): 393.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
- Sambrook J. and Russell D. W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NewYork.
- Schroll C., Barken K. B., Krogfelt K. A., Struve C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 10: 179.
- Seidler R. J., Knittel M. D. and Brown C. (1975). Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella* pneumonia from clinical and environmental sources. *Appl. Environ. Microbiol., 29*(6): 819-825.
- Selina F., Talha K. A., Islam A., Hasan Z., Hyder M., Selvapandian S. (2014). Organisms associated with ventilator associated pneumonia (VAP) in intensive care units (ICU). *J. BSA* 22: 72–77.
- Shon A. S., Bajwa R. P., Russo T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 4:107–118.
- Shu H., Fung C., Liu Y., Wu K., Chen Y., Li L., Liu T., Kirby R., Tsai S. (2009). Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology*. 155: 4170–4183.
- Shulman M. J., Hallick L. M., Echols H., Signer E. R. (1970). Properties of recombination-deficient mutants of bacteriophage lambda. *J Mol Biol*. 52:501–520.
- Stahl F. W., Crasemann J. M., Stahl M. M. (1975). Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. III. Chi mutations are site-mutations stimulating rec-mediated recombination. *J Mol Biol*. 94:203–212.
- Stamm W. E., Weinstein R. A., Dixon R. E. (1981). Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections, Am J Med 70(2)393-397.
- Struve C. and Krogfelt K. A. (2004) Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environmental microbiology,* 6(6): 584-590.

- 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. *Infect Immun* 77:5016–5024.
- Tarkkanen A. M., Allen B. L., Williams P. H., Kauppi M., Haahtela K., Siitonen A., Orskov I., Orskov F., Clegg S., Korhonen T. K. (1992). Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infect Immun* 60:1187–1192.
- Van Duin D., Cober E., Richter S., Perez F., Kalayjian L. C., Salata R. A., Evans S., Fowler V. G., Bonomo R. A., Kaye K. S. (2015). Residence in skilled nursing facilities is associated with tigecycline non-susceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae. Infect Control Hosp Epidemiol*. 36:942-948.
- Voulgari E., Poulou A., Koumaki V., Tsakris A. (2013). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? *Future Microbiol*. 8(1): 27–39.
- Vuotto C., Longo F., Balice M., Donelli G., Varaldo P. (2014). Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella* pneumoniae. *Pathogens*, *3*(3): 743-758.
- Wall D. and Kaiser D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Molecular Microbiology*. 32: 1-10.
- Wang H., Wilksch J. J., Chen L., Tan J. W., Strugnell R. A., Gee M. L. (2017). Influence of Fimbriae on Bacterial Adhesion and Viscoelasticity and Correlations of the Two Properties with Biofilm Formation. *Langmuir*. 33(1):100-106.
- Wei D., Wang M., Shi J., Hao J. (2012). Red recombinase assisted gene replacement in *Klebsiella pneumonia*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 39:1219–1226.
- Williams P., Chart H., Griffiths E., Stevenson P. (1987). Expression of high affinity iron uptake systems by clinical isolates of *Klebsiella. FEMS Microbiol. Lett*. 44:407–412.
- Wilson R B., Davis D., Mitchell A P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol.* 181(6):1868–1874.
- Wooldridge K. G. and Williams P. H. (1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(4): 325-348.
- Wu C. C., Huang Y. J., Fung C. P., Peng H. L. (2010). Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. *Microbiology* 156:1983–1992.
- Wu M. and Li X. (2015). *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa. Molecular Medical Microbiology* 3: 1547-1564.
- Yamamoto S., Izumiya H., Morita M., Arakawa E., Watanabe H. (2009). Application of λ Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: Simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene* 438: 57–64.
- Yang J., Sun B., Huang H., Jiang Y., Diao L., Chen B., Xu C., Wang X., Liu J., Weihong Jiang W. and Yang S. (2014). High-Efficiency Scarless Genetic Modification in Escherichia coli by Using Lambda Red Recombination and I-SceI Cleavage. *Appl Environ Microbiol.* 80(13): 3826–3834.
- 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 5046–5054.
- Yu D., Ellis H. M., Lee E. C., Jenkins N. A., Copeland N. G., Court D. L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 97(11):5978-83.

- Yu W. L., Ko W. C., Cheng K. C., Lee H. C., Ke D. S., Lee C. C., Fung C. P., Chuang Y. C. (2006). Association between rmpA and magA genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin. Infect. Dis*. 42: 1351–1358.
- Yu W. L., Ko W. C., Cheng K. C., Lee C. C., Lai C. C., and Chuang Y. C. (2008). Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 62*(1): 1-6.
- Zhang J., van Aartsen J. J., Jiang X., Shao Y., Tai C., He X., Tan Z., Deng Z., Jia S., Rajakumar K. and Ou H. (2011). Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. *J. Microbiol. Methods* 84(2): 283–289.