



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Maestría en Ciencias Microbiológicas

**Estudios sobre el pili tipo IV en *Klebsiella pneumoniae*: enfoque
bioinformático y experimental**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
(MICROBIOLOGÍA) CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA

PRESENTA:

IBQ. Dulce Lizbeth Santos Rodríguez

DIRECTOR DE TESIS: D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

CO-DIRECTOR: D.C. Israel Aguilar Ordoñez

Fecha: 05.25



BUAP

Puebla, Pue. a 20 de noviembre 2024.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA CICM-
ICUAP
PRESENTE.


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría de la alumna Dulce Lizbeth Santos Rodríguez, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


“Estudios sobre el pili tipo IV de *Klebsiella pneumoniae*: enfoque bioinformático y práctico”

A nuestro juicio, la alumna **Dulce Lizbeth Santos Rodríguez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

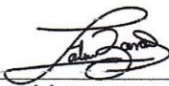
Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hdez.


D.C. Miguel Castañeda Lucio


D.C. Alberto Ramírez Mata


D.C. Patricia Lozano Zarain

Posgrado en Ciencias
Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

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

Agradecimientos Institucionales

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada en el Programa de Maestría en Ciencias Microbiológicas con opción en Bioquímica y Genética, CVU: 1094916.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) por el apoyo otorgado en el uso de equipos de laboratorio para realizar este proyecto.

Agradecimientos personales

A la Dra. Claudia Fabiola Martínez de la Peña por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto bajo su asesoría, por los conocimientos brindados, paciencia, disponibilidad, empatía y calidez que siempre ha mostrado en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Israel Aguilar Ordoñez por su asesoría en la parte bioinformática, por no solo limitarse a compartirme sus conocimientos teóricos de la materia sino además me enseñó que el trabajo se puede realizar de una manera más práctica y dinámica. Por siempre mostrar interés y disponibilidad en ayudarme.

A la Dra. Margarita María de la Paz Arenas por los consejos, interés y disponibilidad brindada para este proyecto y siempre tener disponibilidad ante cualquier duda que tuviera, por su tiempo para la revisión de este proyecto.

A la Dra. Patricia Lozano por brindarnos la cepa de trabajo de estudio y por compartir información fundamental para este trabajo.

Al Dr. Miguel Castañeda Lucio y al Dr. Alberto Ramírez Mata por su disponibilidad y observaciones en la revisión de este escrito.

A mis compañeros de laboratorio Aranza y Charlen por su compañerismo, apoyo y empatía durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco, principalmente a mis padres por todo su apoyo incondicional durante toda mi trayectoria profesional, amor, comprensión y por siempre estar presentes aún en la distancia.

Índice	
Abreviaturas	8
Resumen	9
1. Introducción	10
1.1 Generalidades sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
1.2 Características morfológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
1.3 Epidemiología	11
1.4 Epidemiología de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en México	12
1.4 Factores de virulencia	13
1.6 Generalidades del pili tipo IV	16
1.7 Componentes del Pili tipo IV	17
1.8 Ensamblaje del pili tipo IV	24
1.9 Clasificación del pili tipo IV	25
1.10 Movilidad tipo <i>Twitching</i>	26
1.11 Movilidad tipo <i>Swarming</i>	28
1.12 Estrategias Bioinformáticas utilizadas en el estudio de los componentes del Pili tipo IV	29
1.13 Bioinformática	30
1.14 Herramientas de la Bioinformática	30
1.15 HMMER	31
1.16 Perfiles ocultos de Markov (HMM)	31
2. Antecedentes	33
3. Justificación	35
4. Hipótesis	36
5. Objetivos	36
6. Materiales y métodos	37
6.2 Material Biológico	39
6.3 Condiciones de crecimiento y mantenimiento de las cepas	40
6.4 Extracción de ADN	40
6.5 Amplificación por PCR	40
6.6 Ensayos de movilidad tipo twitching y swarming en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
6.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
6.8 Extracción de ARN	43
6.9 Purificación de ARN	43

6.10 Síntesis de ADNc.....	44
6.12 RT- PCR punto final.....	45
7. Esquema de trabajo	46
8. Resultados	47
8.1.2 Construcción de perfiles ocultos de Markov	47
8.3 Búsqueda de homólogos de genes y proteínas en diferentes genomas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	48
8.4 Caracterización de los genes homólogos encontrados que participan en el pili tipo IV en diferentes genomas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
8.5 Ensamblaje de Kp003	56
8.6 Anotación y búsqueda de genes de virulencia en Kp003	59
8.7 Identificación de los genes del pili tipo IV en el genoma de Kp003	61
8.8 Diseño de oligonucleótidos.....	64
8.9 Los genes involucrados en la biogénesis del pili tipo IV se encuentran presentes en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae</i> cepa Kp003...	65
8.10 <i>Klebsiella pneumoniae</i> presenta movilidad tipo twitching y swarming	67
8.11 Estructuras similares al pili tipo IV se presentan bajo condiciones de movilidad tipo swarming en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	69
8.12 Expresión de <i>pilA</i> y <i>pilO</i> bajo condiciones de movilidad tipo swarming en <i>K. pneumoniae</i>	71
9. Discusión.....	73
10. Conclusiones	77
11. Perspectivas	78
12. Referencias	79

Índice de figuras

Figura 1 Factores de virulencia en <i>K.pneumoniae</i>	13
Figura 2 Pilina mayor del pili tipo IVa.	18
Figura 3 Arquitectura del cuerpo basal del pili tipo IV.	21
Figura 4 Ensamblaje del pili tipo IV.....	25
Figura 5 Comportamiento del pili durante la Movilidad tipo twitching.....	27
Figura 6 Movilidad twitching en <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. maltophilia</i>	28
Figura 7 Influencia de <i>pilA</i> en movilidad swarming.....	29
Figura 8 Distribución y organización de los genes que codifican las proteínas de la biogénesis del pili tipo IVa.	48
Figura 9 Perfil oculto de Markov.....	47
Figura 10 Hits encontrados en la secuencia genómica de <i>K. pneumoniae</i> ATCC13883..	49
Figura 11 Hits encontrados en <i>K. pneumoniae subsp. pneumoniae</i> HS11286.....	50
Figura 12 Hits encontrados en <i>K. pneumoniae subsp. pneumoniae</i> NTUH.....	51
Figura 13 Alineamiento de las pilinas mayores (<i>pilA</i>) identificadas en secuencias de <i>K. pneumoniae</i>	54
Figura 14 Características de los hits de aminoácidos de <i>K. pneumoniae subsp. pneumoniae</i> HS11286 (NC_016845), NTUH-K2044 (NC_012731.1) y ATCC 13883 (NZ_CP040993).....	55
Figura 15 Clasificación y caracterización de la secuencia ensamblada de Kp003....	57
Figura 16 Árbol filogenético de Kp003 y secuencias de <i>K. pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	58
Figura 17 Porcentaje de identidad entre los genes de <i>K. pneumoniae</i> (Kp003).....	62
Figura 18 Ubicación de los genes del pili tipo IV encontrados en Kp003.....	63
Figura 19. Imagen representativa de los oligonucleótidos diseñados para todos los genes de biogénesis de pili tipo IV de Kp003.....	64
Figura 20 Amplificación de los genes del pili tipo IV putativo de <i>K. pneumoniae</i>	66
Figura 21 Ensayos de movilidad tipo twitching.....	68
Figura 22 Ensayos de movilidad tipo swarming.....	69
Figura 23 Microscopias electrónica TEM en Kp003.....	70
Figura 24 Microfotografía electrónica TEM de <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> ATCC13883.....	71
Figura 25 RT-PCR punto final de Kp003.....	72

Índice de tablas

Tabla 1 Nombres de los genes de los componentes del Pili tipo IV en diferentes microorganismos	19
Tabla 2 Diferencias entre pili tipo IV clases “a” y “b”	20
Tabla 3 Secuencias utilizadas para el análisis <i>In silico</i>	31
Tabla 4 Datos de la cepa ATCC 13883	
Tabla 5 Primers utilizados en la amplificación de los genes del pili tipo IV	34
Tabla 6 Mezcla de reacción para la amplificación de genes del pili tipo IV con ADNg	35
Tabla 7 Mezcla de reacción para la purificación de ARN.....	37
Tabla 8 Mezcla de reacción inicial para la síntesis de ADNc.....	38
Tabla 9 Mezcla de reacción para la amplificación de los genes del pili tipo IV con cDNA.	39
Tabla 10 Elementos del pili tipo IV recopilados de diferentes Microorganismos identificados con pili tipo IVa	42
Tabla 11 Datos de ensamblaje de la cepa Kp003.....	52
Tabla 12 Factores de virulencia y genes de resistencia anotados en Kp003.....	55
Tabla 13 Genes amplificados por PCR en las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60

Abreviaturas

Símbolo	Abreviatura
TFP	Pili tipo IV (Type Four Pili)
N-terminal	Extremo amino terminal
µm	Micrómetros
nm	Nanómetros
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
LPS	Lipopolisacárido
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico

Resumen

El pilus tipo IV se encuentra conformado por subunidades de pilina. La subunidad principal es codificada por el gen *pilA*, y se clasifica en “tipo a” o “tipo b” de acuerdo con la longitud que presente la secuencia del péptido señal y al primer aminoácido de la pilina madura (Chang *et al.*, 2016). Recientemente se demostró la presencia del gen *pilA* en una cepa clínica de *K. pneumoniae* (Kp003), obtenida del hemocultivo central de un paciente con sepsis neonatal del Hospital del Niño Poblano. El análisis de esta secuencia presenta un péptido señal corto de seis aminoácidos y una pilina madura que comienza con fenilalanina, lo cual indica la presencia de una pilina de tipo IVa. Además, en los ensayos transcripcionales bajo condiciones de movilidad tipo *twitching* y *swarming* se observó que *pilA* fue expresada a las 72 horas de incubación.

Por los antecedentes anteriores y dada la importancia del pili tipo IV en la virulencia de bacterias patógenas, el objetivo de este trabajo fue identificar los demás componentes genéticos que conforman el pili tipo IV en *K. pneumoniae* mediante técnicas bioinformáticas y experimentales. Para lograrlo se realizó la búsqueda *in silico* de genes del pili tipo IV en secuencias de *Klebsiella pneumoniae* públicas y en la cepa clínica Kp003, buscando elementos homólogos a partir de una base de datos construida con las secuencias de los elementos del pili tipo IV provenientes de los diferentes microorganismos en los que este ha sido reportado antes. Se identificaron posibles genes que codifican para diez proteínas similares involucradas en el pili tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Myxococcus xanthus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Francisella tularensis* y *Haemophilus influenzae* con una similitud promedio del 48 al 51%. Estos genes corresponden a las pilinas menores y mayores, ATPasas de ensamblaje y retracción, la prepilin peptidasa, una secretina, la proteína transmembranal y al complejo multiproteico PilM, PilN y PilO. Posteriormente mediante ensayos de PCR se amplificaron los diez genes predichos por el análisis bioinformático en la cepa clínica Kp003. Además, para comparar si los genes del pili tipo IV sólo se encontraban presentes en el genoma de la cepa clínica Kp003 o si se encontraban también en otras cepas de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*. Se utilizó la cepa tipo ATCC de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (Schroeter) Trevisan ATCC 13883. En dicha cepa solo cinco de los genes lograron observarse mediante PCR. Estos resultados confirman la existencia de genes del pili IV en el genoma. Por otro lado, se realizaron microscopías de transmisión electrónica (TEM) en muestras de la cepa Kp003 bajo condiciones de movilidad tipo *swarming*, donde se observó la presencia de estructuras filamentosas y largas similares al pili tipo IV. Finalmente, en el análisis de la expresión de los genes bajo condiciones de movilidad *swarming* por RT-PCR se observó la presencia de *pilA* y *pilO* en Kp003. Nuestros resultados sugieren la presencia de los elementos genéticos del pili tipo IV en *Klebsiella pneumoniae* Kp003, y la expresión de al menos dos de ellos en condiciones de movilidad *swarming*. Cabe mencionar que no se identificaron homólogos mediante la búsqueda *In silico* para *pilP* y *TsaP*, así como otras pilinas menores.

Palabras clave: *K. pneumoniae*, Pilinas, Pili tipo IV, *swarming*, *twitching*.

1. Introducción

1.1 Generalidades sobre *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, donde también se agrupan géneros de interés clínico como *Shigella*, *Salmonella* y *Escherichia coli*. En 1875 se aísla por primera vez de pacientes con neumonía por Edwin Klebs y es descrita en 1882 por Carl Friedländer (Köhler y Mochman, 1987; Bengoechea & Pessoa, 2019). *K. pneumoniae* se puede encontrar viviendo en una amplia variedad de nichos ambientales y en asociación con el hospedador (Tártara, 2013; Wyres *et al.*, 2020). Está presente en el agua, el suelo, en la superficie de las plantas, en animales y puede colonizar dispositivos médicos tales como catéteres, sondas y ventiladores. (Podschun *et al.*, 2001). Se ha descrito anteriormente que el medio ambiente actúa como un reservorio de *K. pneumoniae*, desde donde puede ser adquirida por humanos, ya sea como colonización o como infección. En los humanos, *K. pneumoniae* es parte de la microbiota de la piel, boca, el tracto gastrointestinal y la orofaringe. A pesar de que esta colonización puede parecer benigna, desde ciertos sitios como el tracto gastrointestinal, *K. pneumoniae* puede ingresar a otros tejidos y causar bacteremias o septicemias (Cheng *et al.*, 1991).

1.2 Características morfológicas de *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es un bacilo gram negativo, con un polisacárido capsular, es fermentadora de lactosa y aerobia facultativa (Ray and Ryan, 2004; Magill *et al.*, 2014; Huynh *et al.*, 2017). Se ha descrito como una bacteria no móvil, sin embargo, en el 2016 se reportó movilidad mediada por flagelos polares en una cepa de *K. pneumoniae* (KpBUAP021) aislada de pacientes con sepsis neonatal proveniente de una colección de aislados de tres hospitales del Estado de Puebla, México; en este mismo estudio se reportó la presencia de genes involucrados en la regulación y composición del flagelo: *fliC*, *fliA*, *fliH* (Carabarin-Lima *et al.*, 2016).

1.3 Epidemiología

K. pneumoniae es un patógeno oportunista y agente causal de infecciones en individuos hospitalizados o inmunodeprimidos. Se registra que *K. pneumoniae* corresponde a un tercio de las infecciones por bacterias gram negativas (Fariñas & Martínez-Martínez, 2013). Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* son: cistitis, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas, endocarditis, neumonía necrotizante, abscesos hepáticos piógenos y endoftalmítis endógena (Effah *et al.*, 2020). El tracto urinario es el sitio más común de infección por *K. pneumoniae*, y se ha descrito que estas infecciones están asociadas a enfermedades como Diabetes mellitus o al uso de catéteres (Schroll *et al.*, 2010). Las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (CAUTI) pueden ser una fuente de organismos invasores en el torrente sanguíneo, conocidas como septicemia. *K. pneumoniae* es la segunda causa principal de estas infecciones del torrente sanguíneo, seguida de *Escherichia coli*, lo cual deriva en infecciones graves con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Clegg y Murphy, 2016). *K. pneumoniae* también está relacionada con las infecciones de heridas quirúrgicas, las cuáles representan aproximadamente el 13% de todas las infecciones causadas por *Klebsiella* (Podschun y Ullmann, 1998; Magill *et al.*, 2014).

Por otro lado, especies de *Klebsiella* han sido identificadas como la tercera causa de neumonía en los Estados Unidos posterior a las 48 horas del ingreso a hospitales. Se ha registrado que *K. pneumoniae* es una de las principales causantes de neumonía asociada al ventilador en pacientes de las unidades de cuidados intensivos (UCI) (Magill *et al.*, 2014). Estudios de los agentes causales de infecciones nosocomiales realizados en el año 2013 en Estados Unidos y la Unión Europea, demuestran que *K. pneumoniae* tiene un 8.0% de prevalencia y resistencia seguido de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* con 11.4% y 11.5% respectivamente (Zarb P. *et al.*, 2012; Weiner L. *et al.*, 2016). Actualmente *K. pneumoniae*, se ha convertido en un patógeno de gran relevancia a nivel internacional, debido a la creciente incidencia de cepas hipervirulentas, definidas como un patotipo

emergente que presenta mayor virulencia que *K. pneumoniae* clásica (cKp) (López et al., 2020).

1.4 Epidemiología de *Klebsiella pneumoniae* en México

K. pneumoniae se encuentra dentro de los principales microorganismos aislados en las infecciones nosocomiales de diferentes unidades médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social. Ocupa el quinto lugar con un 7.6% de prevalencia en unidades Médicas de alta especialidad (Flores A. et al. 2016).

Un estudio prospectivo de aislados causantes de infección comunitaria y nosocomial realizado por diferentes Institutos de Salud del Estado de Sonora del año 2008 al 2009 indicó una prevalencia de 35.3 %. Esta prevalencia se presentó en pacientes hospitalarios por *K. pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Navarro-Navarro et al., 2011). Otro estudio similar realizado por Fuentes-González y Ahumada-Topete (2021) en enterobacterias del 2015 al 2018 demostró que *K. pneumoniae* presentó una prevalencia del 12.2%.

Por otro lado, de acuerdo con lo reportado por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica en el 2022, *K. pneumoniae* es de los principales agentes causales de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (2022).

1.4 Factores de virulencia

K. pneumoniae posee características que le ayudan a su crecimiento y protección de la respuesta inmune del hospedero. La virulencia de *K. pneumoniae* es proporcionada por diferentes factores que pueden provocar infecciones y resistencia a los antibióticos. Hasta ahora se han descrito cuatro factores de virulencia: la producción de sideróforos, la presencia de pili o fimbrias, el lipopolisacárido y la cápsula en *K. pneumoniae* en cepas clásicas como en hipervirulentas (Wang et al., 2020c; Paczosa M. y Mecsas J., 2016). Estos factores se observan en la figura 1.

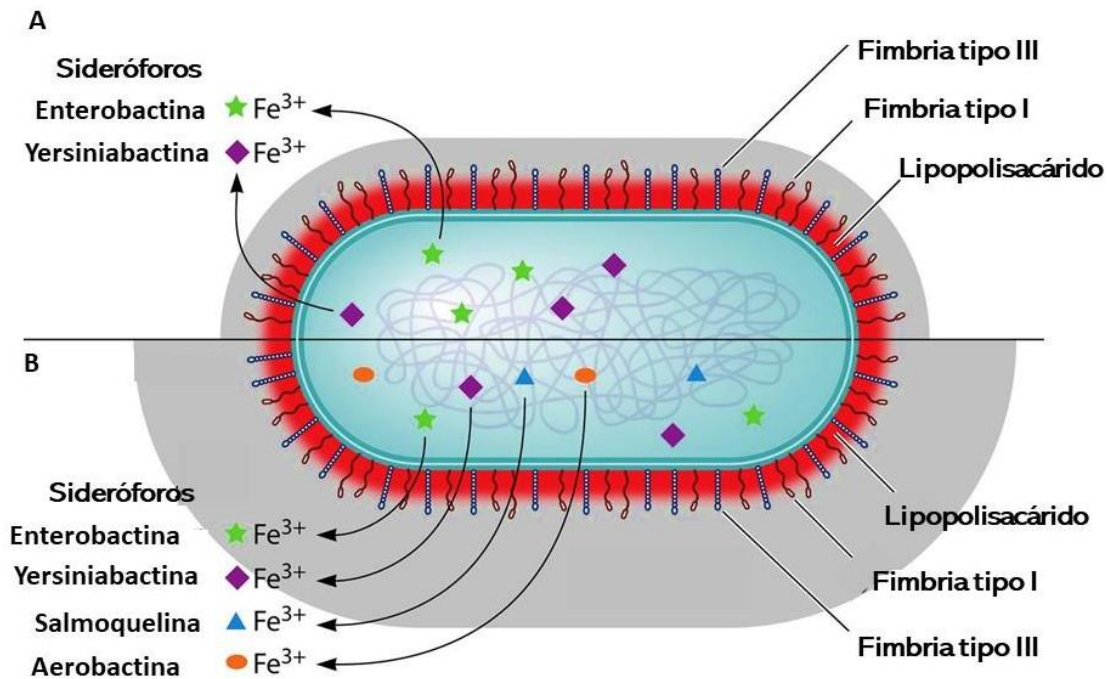


Figura 1 Factores de virulencia en *K.pneumoniae*. (A) Cepa clásica (B) Cepa hipervirulenta. Ambas cepas muestran la presencia de sideróforos (representados con figuras geométricas), fimbrias del tipo I y III y el lipopolisacárido. La cepa hipervirulenta se caracteriza por ser hipercapsulada. Modificado de Paczosa M. y Mecsas J. (2016)

1) Cápsula

La cápsula es el factor de virulencia de *K. pneumoniae* más estudiado. Está definida como una matriz de polisacárido extracelular que envuelve a las bacterias. Por su ubicación es el primer componente bacteriano que interactúa

con el hospedero. Cumple múltiples funciones, entre las que se encuentra la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero (Cress *et al.*, 2014). Esta evasión se debe a que induce una respuesta inmunológica defectuosa del hospedador en la maduración de células dendríticas (DC) y la producción de citocinas Th1 al obstaculizar la unión e internalización bacteriana (Domenico *et al.*, 1994). Además, reduce la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos del hospedador. Encubre las estructuras de la pared celular y la membrana de la opnofagocitosis imitando antigénicamente los glicanos del hospedador (Dzul *et al.*, 2011). Las cepas clásicas de *K. pneumoniae* producen una cápsula que pertenece a los serogrupos K1 a K78. Los serogrupos K1 y K2 están asociados con una mayor patogenicidad. Las cepas hipervirulentas forman una hipercápsula debido a que amplifican la producción de material capsular, lo que da como resultado una cápsula aparentemente más grande. La cápsula producida por cepas hipervirulentas es frecuentemente del serogrupo K1 y del serogrupo K2. La hipercápsula puede contribuir significativamente a la patogenicidad de *K. pneumoniae* (Patel *et al.*, 2014). Se ha demostrado que en los tipos de cápsula K1 y K2 (carentes de manosa y ramnosa) no pueden ser reconocidos por receptores de lectina de macrófagos para inducir la fagocitosis (Athamna *et al.*, 1991; Fung *et al.*, 2002).). Además, se identificó que la expresión mejorada de fructosa-1, 6-bisfosfato aldolasa (FBA) en K1 hvKP podría proteger a las bacterias contra la muerte de neutrófilos en niveles altos de glucosa (Lee *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha reportado que la hipercapsula se encuentra la proteína de superficie Wzi de *K. pneumoniae*, cuya pérdida haría que *K. pneumoniae* fuera notablemente menos virulenta o no virulenta (Zhu *et al.*, 2021).

2) Sideróforos

Uno de los oligoelementos que los microorganismos necesitan para realizar diferentes funciones metabólicas es el hierro. Los sideróforos son metabolitos

secundarios que capturan el hierro de las reservas ambientales y lo entregan a las células a través de receptores específicos (Kramer J. *et al.*, 2020). Como parte de la respuesta inmune durante la infección, el hospedador secuestra el hierro para restringir el crecimiento de patógenos. Por lo anterior el hierro es un recurso limitado en el hospedador, provocando que *K. pneumoniae* deba adquirirlo del medio ambiente para prosperar. Para lograrlo, *K. pneumoniae* secreta sideróforos que pueden robar el hierro de las proteínas quelantes del hospedero. Entre los sideróforos que *K. pneumoniae* secreta se conocen la enterobactina y yersiniabactina, que se producen en cepas clásicas e hipervirulentas. Por otro lado, la salmoquelina y la aerobactina rara vez son producidas por cepas clásicas, pero son secretadas típicamente por cepas hipervirulentas (Russo *et al.*, 2014; Paczosa M. y Mecsas J., 2016).

3) Lipopolisacárido (LPS)

En *K. pneumoniae* el LPS está presente debajo de la capa capsular. Entre las propiedades biológicas que se le atribuyen al LPS se encuentran las siguientes: mantiene y organiza la membrana externa, inhibidor de anticuerpos, variaciones antigénicas, activador del sistema inmune y mediador de la adherencia a las células y tejidos hospederos (Whitfield, 2002; Bulati *et al.*, 2021). El LPS está compuesto por un oligosacárido distal hidrofílico repetitivo (antígeno O), un polisacárido de núcleo hidrofílico y el dominio hidrofóbico (lípidos A). El lípido A es un disacárido de glucosamina con diferentes niveles de acilación y fosforilación, que en ciertos casos presenta sustituyentes adicionales en el esqueleto del azúcar. Además, el lípido A es el principal componente inmunoestimulador, debido a su reconocimiento por parte del receptor transmembranal TLR4 del sistema inmunitario del hospedero (Paczosa & Mecsas, 2016; Patro & Rathinavelan, 2019). El antígeno O del LPS puede unirse al componente C3b del sistema inmune innato, promoviendo la supervivencia bacteriana. La estructura variable del antígeno O define el serotipo de la bacteria,

pero el número de antígenos O es considerable de una especie a otra. Hasta ahora se han descrito 9 serotipos del antígeno O de *K. pneumoniae*, siendo el serotipo O1 el más común en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Hansen et al., 1999).

4) Fimbrias

Las fimbrias consisten en subunidades interconectadas de una sola proteína llamada pilina que forma una varilla rígida en forma de hélice enrollada (Forero M. et al., 2006). Las fimbrias tipo 1 y tipo 3 son mediadores importantes de la adhesión de *K. pneumoniae*, ambos tipos de fimbrias se ensamblan mediante la vía chaperona-Usher, y se han caracterizado como factores de patogenicidad (Hsieh et al., 2016). Las fimbrias de tipo 1 se expresan en la mayoría de las enterobacterias. El grupo de genes fimbriales de *K. pneumoniae* tipo 1 es homólogo al de *E. coli*. El gen *fimA* codifica la subunidad FimA, que constituye la mayor parte de la estructura, mientras que las propiedades adhesivas dependen de la subunidad menor FimH. Las fimbrias tipo 1 se denominan de unión sensible a manosa, debido a que se unen a glicoproteínas d-manosiladas (Rosen et al., 2008).

Las fimbrias de tipo 3 son filamentos en forma de hélice. En *K. pneumoniae*, estas fimbrias están codificadas por el grupo operón *mrkABCD* (Tarkkanen AM. et al., 1998). El operón que codifica la fimbria de tipo 3 se encuentra y se expresa en casi todos los aislados de *K. pneumoniae*. A diferencia de las fimbrias de tipo 1, las fimbrias de tipo 3 son no pueden unirse a la manosa. Hasta ahora no se ha reportado un receptor específico para este tipo de fimbrias. Se ha reportado que se unen a proteínas de colágeno tipo IV y V de la matriz extracelular (Sebghati et al., 1998) , y que favorecen la formación de *biofilm* (Scheld W.M. 1991; Allen BL et al., 1991; Struve C. et al., 2009).

1.6 Generalidades del pili tipo IV

El pilus tipo IV (TFP) por sus siglas en inglés, se describió por primera vez en el año de 1970 en la bacteria *P. aeruginosa*. Está compuesto por un filamento extracelular

y un cuerpo basal, este último se ha descrito como un complejo que cruza la pared celular. Ambos le dan la capacidad de extenderse y retraerse (Chang *et al.*, 2016). Los TFP tienen un diámetro de 5 a 7 nm y pueden extenderse hasta varias micras de longitud. Esta estructura filamentosa y de arquitectura helicoidal está localizada en la superficie de una gran variedad de bacterias gram negativas, entre las que se encuentran *P. aeruginosa*, *M. Xanthus*, *N. meningitidis* y *Vibrio cholerae*. También se encuentra en menor frecuencia en gram positivas como *Clostridium pefringens* y *Clostridioides difficile* (Craig *et al.*, 2004; Clausen *et al.*, 2009b).

El TFP se considera un factor importante en la virulencia debido a diferentes funciones que ayudan a la bacteria a colonizar y evadir la respuesta inmune de la célula hospedadora. Entre estas se encuentra la adhesión a células del hospedador, movilidad, captación de ADN, formación de microcolonias y biopelículas. Además, se ha descrito que tiene la función de ser receptor para bacteriófagos (Bertozzi-Silva *et al.* 2016; Ellison *et al.*, 2018). La presencia del TFP en muchas bacterias patógenas, la importancia que tiene en la virulencia y la capacidad de provocar una respuesta inmune ha hecho que su estructura sea relevante para el estudio como diana para vacunas (Craig y Li, 2008).

Por otro lado, se ha descrito que el TFP está relacionado con otros sistemas, y que las proteínas involucradas en su ensamblaje presentan una alta homología con el sistema de secreción de tipo II en bacterias gram negativas. También presenta similitudes con los sistemas de competencia (Com) para la captación de ADN en bacterias gram-positivas y con los flagelos de arqueas (Sauvonnnet *et al.*, 2000; Melville y Craig, 2013).

1.7 Componentes del Pili tipo IV

Como se describió anteriormente el TFP cuenta con homólogos de sus componentes principales. Los nombres de estas pilinas varían según el organismo, como se resume en la Tabla 1. Los componentes principales del TFP son la subunidad de proteína PilA o pilina mayor, la cual está presente en miles de copias y las pilinas menores, que están presentes en menor abundancia. Se ha observado

en diferentes especies de bacterias gram negativas, que las pilinas suelen tener una longitud de 145-160 aminoácidos. También tienen una estructura primaria distinta, una secuencia líder corta con carga positiva y un dominio amino-terminal altamente conservado e hidrófobo (Chang *et al.*, 2016). La secuencia líder N-terminal corta de las pilinas ayuda a su correcta inserción en la membrana citoplasmática mediante el traslocón SecYEG (Strom *et al.*, 1993). Las pilinas tipo IV comparten una arquitectura común: Una hélice- α con un péptido señal en su extremo N-terminal, un par de cisteínas en la región C-terminal con un dominio globular que está conformado por hojas- β . El extremo N-terminal sobresale de la estructura y el extremo C-terminal está incrustado en un dominio globular e interactúa con una hoja β antiparalela de cuatro a cinco hebras. En el dominio globular se encuentran dos regiones variables entre las pilinas: el bucle $\alpha\beta$, que está situado entre $\alpha 1$ y la hoja β ; y la región D (Figura 2).

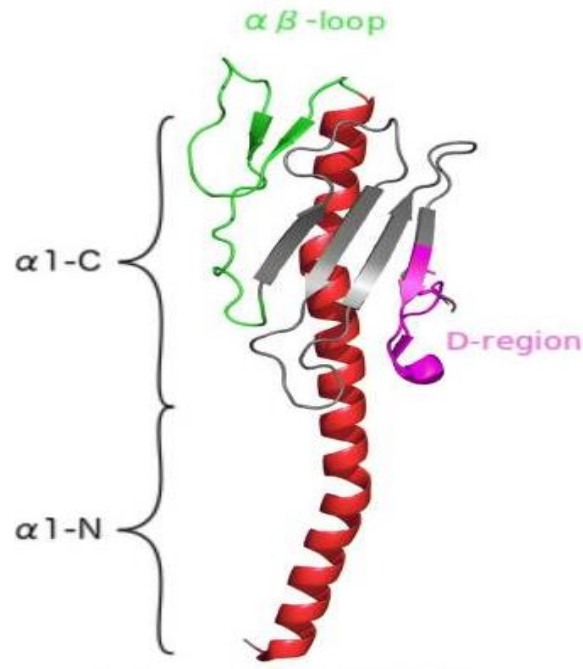


Figura 2 Pilina mayor del pili tipo IVa. Representación molecular de la subunidad principal PilA de *Pseudomonas aeruginosa*. La hélice α central está coloreada en rojo, se indican la parte N-terminal transmembrana ($\alpha 1-N$) y la parte C-terminal ($\alpha 1-C$) del dominio plegado.

El bucle $\alpha\beta$ y la región D están resaltados en verde y magenta, respectivamente.
Recuperado de Jacobsen et al., (2020)

Tabla 1 Nombres de los genes de los componentes del Pili tipo IV en diferentes microorganismos

Bacteria	Pilina mayor	Prepilin peptidasa	ATPasa de ensamblaje	ATPasa de retracción	Proteína integral de membrana	Secretina	Pilinas menores	Complejo multiproteico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>pilA, pilE</i>	<i>pilD</i>	<i>pilB</i>	<i>pilT/pilU</i>	<i>pilC</i>	<i>pilQ</i>	<i>pilE, pilX, pilW, pilV, fimU</i>	<i>pilM, pilN, pilO, pilP</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>pilE</i>	<i>pilD</i>	<i>pilF</i>	<i>pilT</i>	<i>pilG</i>	<i>pilQ</i>	<i>pilH, pill, pilJ, pilK, pilL</i>	<i>pilN, pilO, pilP</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>pilE</i>	<i>pilD</i>	<i>pilF</i>	<i>pilT</i>	<i>pilG</i>	<i>pilQ</i>	<i>pilV</i>	<i>pilM, pilN, pilO, pilP</i>
<i>Francisella thularensis</i>	<i>pilE</i>	<i>pilD</i>	<i>pilF</i>	<i>pilT</i>	<i>pilG</i>	<i>pilQ</i>	<i>pilX</i>	<i>pilN, pilO</i>
<i>Dichelobacter nodosus</i>	<i>fimA</i>	<i>fimP</i>	<i>fimN</i>	<i>pilT</i>	<i>fimO</i>	<i>pilQ</i>	<i>fimZ</i>	-
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>tcpA</i>	<i>tcpJ</i>	<i>tcpT</i>	-	<i>tcpO</i>	<i>tcpC</i>	-	<i>tcpR, tcpD, tcpS</i>
<i>Myxococcus Xanthus</i>	<i>pilA</i>	<i>pilD</i>	<i>pilB</i>	<i>pilT</i>	<i>pilC</i>	<i>pilQ</i>	<i>pilX1, pilV1, pilW1</i>	<i>pilM, pilN, pilO, pilP</i>

Además de las pilinas mayores y menores, el pili tipo IV se compone por otras proteínas que forman complejos y se localizan en la membrana interna, el periplasma y la membrana externa (figura 3).

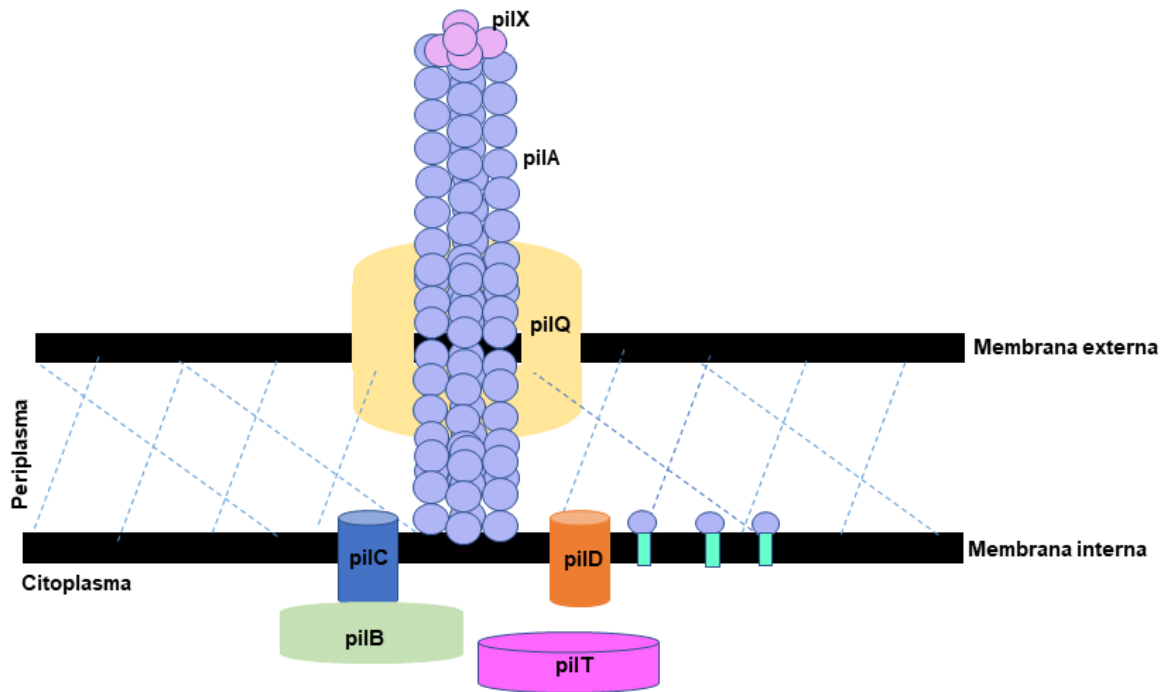


Figura 3 Arquitectura del cuerpo basal del pili tipo IV. Se muestra la organización de las proteínas ubicadas en la membrana externa, interna, periplasma y citoplasma que conforman al cuerpo basal.

ATPasa (PilB)

PilB es una proteína de carácter hexamérico. La función que se ha descrito en esta ATPasa es la de servir como un motor molecular que genera la energía necesaria para la incorporación de las subunidades de pilinas. Esto lo hace a través de la membrana interna. PilB genera la tracción que se necesita para la extrusión del pili hacia la superficie de la bacteria. El filamento del pili tiene un diámetro de ~6 nm y puede extenderse hasta varios micrómetros de longitud. (Clausen, Jakovljevic, et al., 2009; Chang *et al.*, 2016).

Proteína integral de membrana (PilC)

La función de PilC es ser el punto de anclaje para las primeras unidades de PilA. Coordina la actividad de las ATPasas de polimerización citoplasmática (PilB) y despolimerización (PilT) mediante la interacción con sus dominios citoplasmáticos. Se ha descrito que PilC se une por su dominio N-terminal a PilB y por el C-terminal a PilT. De esta manera forma una estructura tipo plataforma entre las ATPasas y transduce la energía generada por éstas hacia la extensión o retracción del pili (Takhar *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2016).

Prepilin peptidasa (PilD)

Se ha reportado que probablemente PilD funciona en los primeros pasos de la biogénesis del pili. La función de PilD consiste en procesar el pre-pilus a su forma de pilina madura, para lograr esto, necesita la presencia de un residuo de glicina invariable en la región N-terminal de PilA así como un ácido glutámico altamente conservado en la posición +5 (LaPointe y Taylor, 2000; Schreiber & Donnenberg, 2002).

Secretina (PilQ)

PilQ se agrupa en 12 unidades multiméricas para formar un poro cilíndrico con un diámetro interno de 5 a 8 nm a través del cual el pili emerge hacia la superficie celular. Su función es asistida por la proteína accesoria PilF (Szeto *et al.* 2011).

ATPasa PilT

La proteína citoplasmática PilT está encargada de la retracción del pili. PilT, al igual que PilB pertenece a la familia de ATPasas AAA+ catalíticas de cadena adicional. Es indispensable para generar la fuerza necesaria para lograr la función del pilus. Es el motor molecular más fuerte conocido y ha sido estudiado extensamente (McCallum *et al.*, 2017). Se ha observado en mutantes que la eliminación de pilT, da como resultado una pérdida total de la función pilus. Aunque las cepas que carecen de pilT permanecen pilosas, son incapaces de mediar la movilidad de espasmos o la captación de ADN, y a menudo exhiben una adherencia superficial alterada a pesar de que típicamente están hiperpiladas (Jones *et al.*, 2015).

Además de estos componentes descritos anteriormente, se requiere de otras proteínas que poseen una homología de secuencia con las subunidades de pilina en sus regiones N- terminal (Craig y Li, 2008). Dichas proteínas están relacionadas con la optimización de etapas del proceso de biogénesis del TFP, estabilizan e interactúan con la secretina, las cuales se describen a continuación:

PiIM

Esta proteína forma un anillo que da cara al lado citoplasmático de la membrana interna, de esta manera se pueden incorporar el resto de las proteínas para la biogénesis del TFP en sentido del citoplasma hacia el periplasma (Chang *et al.*, 2016, Goosens *et al.*, 2017).

PiIP

Es una lipoproteína que se encuentra en el periplasma, en presencia o ausencia de otras proteínas (Sakai y Komano, 2002). Tiene un sitio de unión lipídica N-terminal, seguido de una región N-terminal no estructurada y un dominio globular C-terminal que adopta una estructura β similar a la lipochalina (Tammam *et al.*, 2011). Forma parte del complejo PiIMNOP, se une a la secretina PilQ y es esencial para la formación del TFP (Balasingham *et al.*, 2007)

PiIN y PiIO

Estas proteínas son homólogos estructurales e interactúan formando heterodímeros. Están localizadas en el periplasma constituyendo un anillo junto con PiIP. Ambas estabilizan la estructura del TFP mediante la interacción de su complejo con la secretina PilQ (Chang *et al.*, 2016).

1.8 Ensamblaje del pili tipo IV

El ensamblaje del TFP involucra la presencia de las diferentes pilinas descritas anteriormente, las cuales en algunos casos están codificadas dentro del mismo operón. Estas pilinas de tipo IV se definen por la forma en que se ensamblan en una estructura de superficie más que por la conservación de su secuencia. Las pilinas son procesadas por una prepilin peptidasa (PilD) antes de ser incorporadas a los filamentos superficiales. Son reconocidas a través de su péptido señal y se transportan por medio de la vía Sec a través de la membrana citoplasmática. El montaje de todos los pili tipo IV requiere de la ATPasa de ensamblaje (PilB), y PilC que puede servir como ancla del pilus citoplásmico. PilB se encarga de proporcionar la energía mediante la hidrólisis de ATP. Esta energía es aportada a la proteína PilC para que pueda generar un movimiento giratorio que provocará la adición de otras pilinas formando un filamento helicoidal con aproximadamente 5 pilinas por giro (Pohlschroder, M., y Esquivel, R. 2015).

Para la retracción del pili se deben desacoplar las pilinas, este paso involucra a la ATPasa (PilT). PilT favorece un giro en PilC que retira las pilinas del filamento haciendo que nuevamente se unan a la membrana interior e impide que puedan reasociarse (Chang *et al.*, 2016; Jakovljevic *et al.*, 2008).

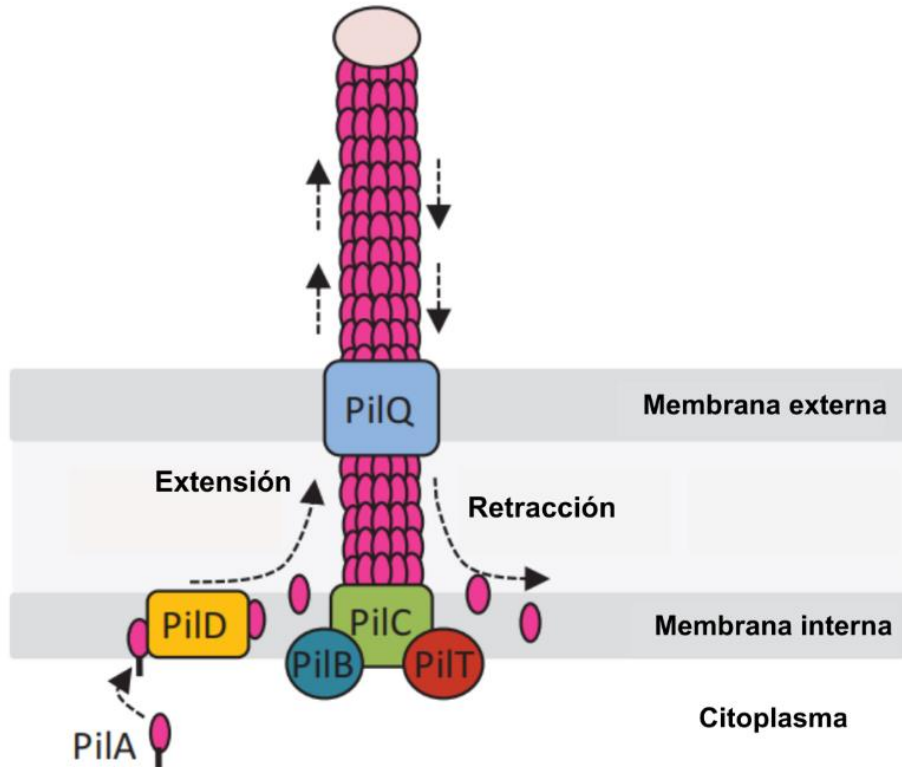


Figura 4 Ensamblaje del pili tipo IV. Se muestran las pilinas involucradas en el montaje del pili en bacterias gram negativas. El péptido señal de las prepilinas es escindido por una prepilin peptidasa. Las ATPasas promueven el impulso o retracción de las pilinas confiriéndole el movimiento al pili. Modificado de Burdman et al. (2011)

1.9 Clasificación del pili tipo IV

El TFP está clasificado en dos subtipos "IVa" y "IVb", esta subdivisión se asigna dependiendo de diferentes características (tabla 2). Entre estas se encuentran la longitud de secuencia del péptido señal y la secuencia de las pilinas maduras. Las pilinas de ambos grupos de tipo IV adoptan variaciones basadas en una arquitectura de "núcleo" similar: un pliegue de tipo α / β , que consiste en una hélice α empaquetada contra una hoja β de cuatro o cinco hebras.

Tabla 2 Diferencias entre pili tipo IV clases “a” y “b”.

Características	IVa	IVb
Longitud del péptido señal	< 10 residuos	15-30 residuos
Primer residuo de la pilina madura	Fenilalanina	Variable
Longitud del pili	150- 160 residuos	50- 80 residuos 180-200 residuos
No. de proteínas requeridas en su biogénesis	~15 o más	~ 10
Organización de los genes	Dispersos en operones en todo el genoma	En un solo operón
Microorganismos donde se ha reportado	<i>P. aeruginosa</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

1.10 Movilidad tipo *Twitching*

La movilidad tipo *twitching* se ha reportado en una amplia gama de patógenos de plantas y animales. Se caracteriza por la extensión de los pilis polares tipo IV, seguido del anclaje a superficies semisólidas o sólidas y finalmente su retracción, esta función es semejante a un gancho de anclaje (figura 5). Se ha demostrado que la movilidad *twitching* es importante en la colonización del hospedero y en la formación de biopelículas. Ensayos *in vitro* con cepas de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* presentan colonias planas, ásperas y extendidas con un borde característico de "vidrio esmerilado" (figura 6 A y B) (Heydorn et al., 2002 ; Zolfaghar et al., 2003). El fenotipo de las figuras 6A y 6B, corresponde a la movilidad twitching y de acuerdo con Turnbull y Whitchurch (2014), donde se muestra una colonia superior y un halo o zona nebulosa de bacterias alrededor (figura 6C).

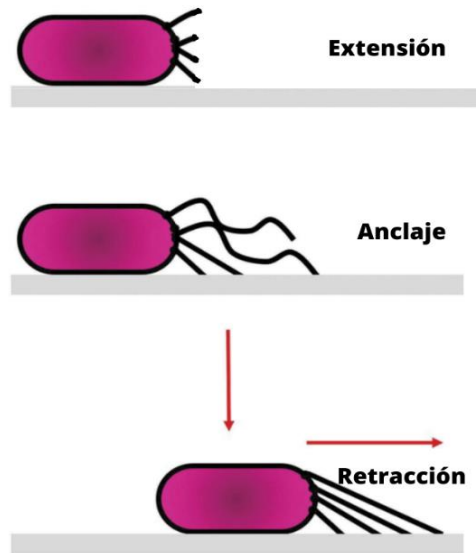


Figura 5 Comportamiento del pili durante la Movilidad tipo *twitching*. Modificado de Kalidasan y Neela (2020).

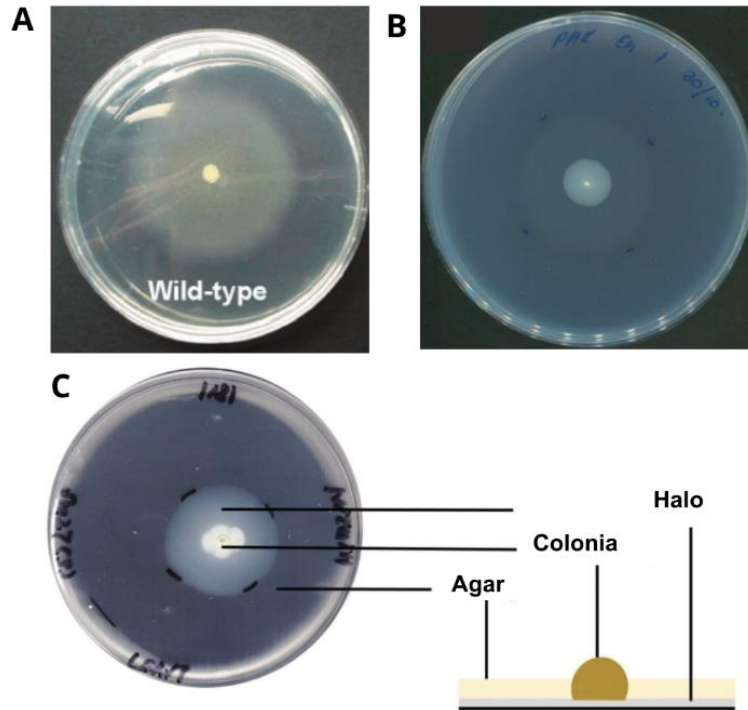


Figura 6 Movilidad *twitching* en *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*. Modificado de Heydorn et al., 2002; Zolfaghar et al., 2003 Kalidasan y Neela (2020)

1.11 Movilidad tipo *Swarming*

La movilidad *swarming* se define como un rápido movimiento superficial bacteriano multicelular impulsado por flagelos giratorios (Kearns, 2010). Estudios realizados con *Pseudomonas aeruginosa* han demostrado que el pili tipo IV puede influir en la actividad de *swarming* (Murray & Kazmierczak, 2008). Mutantes en *pilR* y *pilA*, de *P. aeruginosa*, ambas deficientes en pili tipo IV, no presentaron movilidad tipo *swarming* (figura 7).

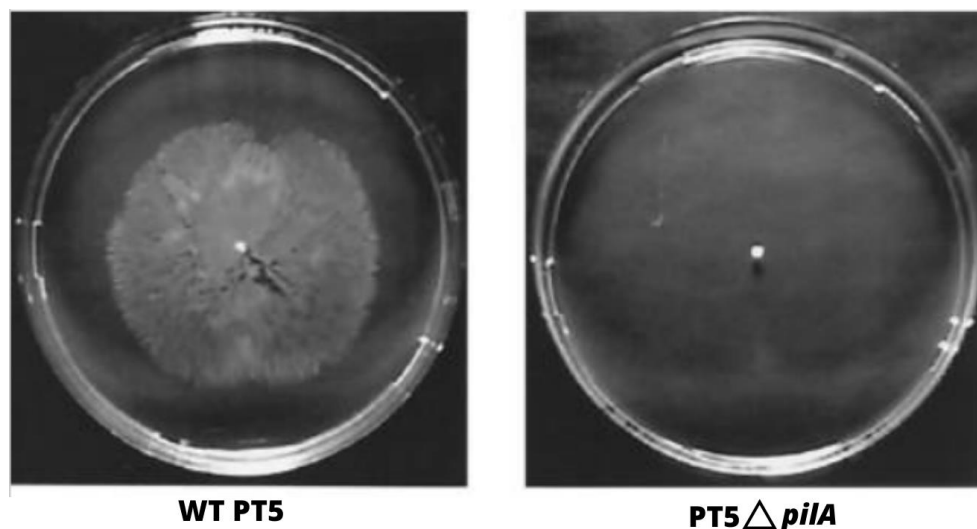


Figura 7 Influencia de *pilA* en movilidad *swarming*. A la izquierda se observa el fenotipo de movilidad *swarming* en la cepa silvestre PT5 de *P. aeruginosa*. A la derecha la mutante con deleción en *pilA*. Recuperado de Köhler et al., (2000).

1.12 Estrategias Bioinformáticas utilizadas en el estudio de los componentes del Pili tipo IV

La detección de PTIV en bacterias gram negativas y más recientemente en gram positivas se ha logrado gracias a diferentes técnicas tanto moleculares como ómicas. Estas últimas, han facilitado el estudio de microorganismos a nivel masivo desde una computadora, utilizando modelos matemáticos y estadísticos.

Berry et al. (2019) reporta la predicción de cinco proteínas similares a pilinas (PilA, PilB, PilC, PilE1 y PilE2) del pilus tipo IV en *Streptococcus sanguinis*. Donde se realizó una recopilación de varias secuencias de *S. sanguinis* y se hizo la predicción de dominios funcionales escaneando la secuencia de proteínas contra firmas de proteínas InterPro. Además se utilizó la herramienta de PilFind, que se dedica a la identificación de la subunidad principal de las pilinas de tipo IV. En otras investigaciones se ha reportado la predicción de pilinas del PTIV empleando un algoritmo para la búsqueda de dominios conservados tanto en bacterias gram negativas (Leong *et al.*, 2017) como en gram positivas (Imam et al., 2011).

De igual manera, el uso de herramientas bioinformáticas ha facilitado conocer las características estructurales de las pilinas. Esto ha permitido demostrar que las

pilinas comparten una forma de paleta con una hélice N-terminal ($\alpha 1$), seguida de un dominio globular (Helaine et al., 2007). Además de acuerdo con las características que estas pilinas presentan en su secuencia, se clasificaron en tipo a o b (Hansen & Forest, 2006). Estos análisis no podrían haberse llevado a cabo sin el uso de la bioinformática.

1.13 Bioinformática

La Bioinformática es una disciplina en evolución que combina las tecnologías computacionales y la biología, con un enfoque que se conoce como biología computacional. El objetivo principal de la bioinformática es facilitar el análisis y la interpretación de datos de experimentos biológicos y estudios observacionales. Entre sus componentes principales se encuentra el desarrollo de herramientas de software, algoritmos y el análisis e interpretación de datos biológicos. Actualmente existen complejos programas de *software* para recuperar, clasificar, analizar, predecir y almacenar datos de secuencias de proteínas y ADN (Moore 2007; Zhang S. y Liu S., 2013).

1.14 Herramientas de la Bioinformática

Las principales herramientas para realizar bioinformática son los programas informáticos e Internet. Lo anterior se debe a que para poder realizar el análisis de secuencias de ADN y proteínas se utilizan programas y bases de datos que están disponibles en línea. En la actualidad se puede descubrir libremente la composición de moléculas biológicas como ácidos nucleicos y proteínas utilizando herramientas bioinformáticas básicas.

1.15 HMMER

HMMER es un software utilizado para realizar búsquedas en bases de datos de secuencias biológicas. Se utiliza para la búsqueda de secuencias de nucleótidos y/o proteínas homólogas. HMMER es accesible para el usuario, puede ser instalado como una herramienta de línea de comandos o mediante servidores de búsqueda en el Instituto Europeo de Bioinformática (Finn et al., 2015). Este programa utiliza secuencias únicas o alineaciones de secuencias múltiples como dato de inicio. Implementa una tecnología basada en perfiles de modelos ocultos de Markov para la identificación de homólogos en secuencias de ADN y la detección de motivos en secuencias de aminoácidos. La búsqueda de motivos ha sido fundamental para identificar dominios conservados dentro de una familia de proteínas, ayudando a deducir su estructura y función dentro de un genoma de interés. Entre el conjunto de herramientas que ofrece HMMER, se encuentra `hmmsearch`, el cual ha sido principalmente utilizado para la identificación de dominios y homólogos proteicos (Jiang & Ganesan, 2016). También se ha reportado el uso de `nhmmer` en estudios para la detección de homólogos de ADN (Wheeler & Eddy, 2013).

1.16 Perfiles ocultos de Markov (HMM)

La búsqueda de homólogos basada en modelos ocultos de Markov (HMM) es un método estadístico que se puede utilizar para describir la evolución de eventos observables que dependen de factores internos, que no son directamente observables. Al evento observado se le denomina “símbolo” y al factor invisible que subyace a la observación un “estado”. Un HMM consta de dos procesos estocásticos, un proceso invisible de estados ocultos y un proceso visible de símbolos observables. Los modelos HMM han sido útiles para modelar secuencias biológicas, como proteínas y secuencias de ADN. Lo anterior debido a que las secuencias biológicas generalmente constan de subestructuras más pequeñas con diferentes funciones que muestran propiedades estadísticas distintas. Habitualmente las proteínas constan de múltiples dominios. Para la identificación de una nueva proteína se pueden predecir los dominios constituyentes

(correspondientes a uno o más estados en un HMM). Además de su ubicación en la secuencia de aminoácidos (observaciones). Como resultado, los HMM se han vuelto cada vez más populares en la biología molecular computacional, y muchos algoritmos de análisis de secuencias de última generación se han construido con modelos HMM (Yoon, 2009).

2. Antecedentes

Estudios previos en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad identificaron mediante pruebas bioquímicas cepas de *K. pneumoniae*. Estas cepas fueron aisladas de pacientes con sepsis neonatal provenientes de tres hospitales. Dos cepas de esta colección de aislados se denominaron cepas 003 y 021, y fueron caracterizadas utilizando los genes *rpoB* y *16s* del ARNr para comprobar su identidad. Se demostró que la cepa 003 corresponde a una *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* y la 021 a la subespecie *rhinoscleromati*. Ambas cepas mostraron un fenotipo de movilidad tipo swarming. El swarming es producido por la acción motora del flagelo, por lo que se buscó la amplificación mediante PCR de los genes *fliA* y *fliC*. Los amplificadores obtenidos de la cepa 021 fueron secuenciados y se reportó una identidad del 98% (*fliC*) y 99% (*fliA*) con el gen *fliC* y *fliA* de *E. coli* K12 (León, 2009). Además, mediante microscopía se observó la presencia de una estructura filamentosa en las cepas 003 y 021 de *K. pneumoniae* y se sugirió la presencia de un pili diferente a los pilis tipo I y III, probablemente un pili tipo IV.

Por lo anterior se analizaron 28 aislados de *K. pneumoniae* de las cepas caracterizadas en trabajos previos en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (León, 2009; Olivar, 2010; León, 2012; Carabarin et al., 2016). En estas cepas se amplificó mediante PCR la secuencia correspondiente a la subunidad de pilina mayor putativa de un pili tipo IV (*pilA*). Al secuenciar uno de los amplificadores se comprueba la presencia de una región de corte para una prepilin peptidasa, la cual es necesaria para la maduración de las pilinas que conforman el pili tipo IV. El conjunto de estos resultados obtenidos sugiere la presencia de un pili tipo IV putativo (López, 2019 tesis de maestría).

Para poder demostrar la presencia del TFP en bacterias y arqueas, se han realizado diferentes estudios *in silico* con ayuda de herramientas bioinformáticas (Imam et al., 2011; Baker et al., 2013; Karami et al., 2021). Estas herramientas han permitido identificar la presencia de genes que codifican proteínas involucradas en el TFP en el microorganismo modelo de estudio. De acuerdo con lo reportado por Sánchez *et al.* (2018) se demostró la presencia de un TFP en la bacteria

Piscirickettsia salmonis. En este estudio se analizaron los genes de las principales proteínas del TFP en el genoma de la cepa LF-89T de *P. salmonis*. Algunos de estos genes se identificaron por homología utilizando Blast del NCBI. De igual manera, en otro estudio se identificaron los genes encargados de la contracción y retracción del TFP en *Acinetobacter baylyi*, utilizando una base de datos de genes y genomas de microorganismos con TFP para realizar la búsqueda de genes homólogos (Leong *et al.*, 2017).

3. Justificación

K. pneumoniae es uno de los agentes etiológicos de diversas infecciones nosocomiales con mayor prevalencia en hospitales a nivel nacional y mundial. *K. pneumoniae* corresponde a un tercio de las infecciones por bacterias gram negativas, entre las que se encuentran infecciones del tracto urinario, cistitis, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas, endocarditis y septicemia. En las familias de bacterias gram negativas se ha registrado la presencia de pilis tipo IV, los cuales se han considerado un factor importante de virulencia en bacterias patógenas. Los pili tipo IV regulan una amplia variedad de funciones que están involucradas en los procesos de adhesión, captación de ADN por procesos conjugativos y motilidad, y en la invasión a las células hospedero. Actualmente se ha considerado a *K.pneumoniae* como una bacteria inmóvil. Sin embargo, estudios realizados por microscopía electrónica en las cepas 003 y 021 se reporta la presencia de una estructura filamentosa similar al pili tipo IV. Así como también se identificó la presencia del gen de *pilA* en la cepa 003. Por lo anterior, es de gran importancia realizar la búsqueda de los componentes genómicos y proteómicos necesarios para la biogénesis del pili tipo IV en *K. pneumoniae*.

4. Hipótesis

Klebsiella pneumoniae posee los genes involucrados en la biogénesis del pili tipo IV.

5. Objetivos

Objetivo general

Identificar y describir los genes de *Klebsiella pneumoniae* que participan en la formación del pili tipo IV.

Objetivos específicos

- 1.- Recopilar secuencias de genes que participan en la biogénesis del pili tipo IV en bacterias gram negativas.
- 2.- Identificar los genes relacionados con la biogénesis del pili tipo IV en genomas de *K. pneumoniae* y Kp003.
- 3.- Observar el fenotipo de movilidad tipo *twitching* y *swarming*.
- 3.- Detectar los genes que participan en la biogénesis del pili tipo IV

6. Materiales y métodos

Recopilación de secuencias genómicas y proteómicas

Se utilizaron las bases de datos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) y del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) para la recolección de secuencias genómicas y proteómicas. Las secuencias utilizadas se describen en la tabla 3.

Tabla 3 Descripción y número de acceso de secuencias genómicas de 7 microorganismos utilizadas para el análisis *In silico* de genes involucrados en la biogénesis del pili tipo IV

Microorganismo / ID	Número de acceso	Fuente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA96	CP007224.1	NCBI
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> strain ATCC 49226	CP045728.1	NCBI
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A Z2491	AL157959.1	NCBI
<i>Myxococcus xanthus</i> strain R31	NZ_CP068048.1	NCBI
<i>Haemophilus influenzae</i> strain 86-028NP	AY816324.1	NCBI
<i>Dichelobacter nodosus</i> strain VCS1703A	NZ_CP031475.1	NCBI
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	NC_005966.1	NCBI

Construcción de alineamientos múltiples

Para realizar los alineamientos de secuencias múltiples se utilizó el programa Clustal W de la página del Centro de Bioinformática de la Universidad de Kioto y se utilizaron los parámetros predeterminados por el programa (Anexo 1) <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>

Búsqueda de genes homólogos

La búsqueda por homología se realizó usando el software HMMER V.3.3.2, esta versión se obtuvo de la página <http://hmmer.org/> y fue instalada en una máquina virtual de Ubuntu 16.04.

Análisis para la caracterización de secuencias homólogas

Los análisis para la predicción de función, búsqueda de motivos y localización subcelular se realizaron en las plataformas de InterproScan, Cello v.2.5 y PilFind.

Secuenciación de Kp003

El DNA extraído de la cepa Kp003 una vez purificado y concentrado a 38.8 ng/μL fue enviado a SeqCenter ubicado en Pittsburgh para la secuenciación del genoma completo. Las bibliotecas de muestras se prepararon utilizando el kit Illumina DNA Prep y los índices UDI IDT de 10 pb, y se secuenciaron en un Illumina NextSeq 2000, produciendo lecturas de 2x151 pb. La demultiplexación, el control de calidad y el recorte del adaptador se realizaron con bcl-convert (v3.9.3).

Ensamble

Todos los análisis de las lecturas obtenidas de la secuenciación se realizaron en la plataforma de Kbase <https://www.kbase.us/>. Para evaluar la calidad de los datos se utilizó el software FastQC y se analizaron los archivos K003_S88_R1_001.fastq y K003_S88_R2_001.fastq (Anexo 4). Debido a que en los resultados del análisis no se obtuvo alguna advertencia en la calidad de los archivos analizados, se procedió

a utilizar ambos archivos de forma íntegra para el ensamblaje del genoma. En el ensamblaje se utilizó SPAdes 3.15.3 a través de la plataforma de acceso abierto Kbase (Arkin et al., 2018). Se seleccionaron los parámetros de entrada predeterminados por el programa debido a que SPAdes tiene sus propios métodos para elegir qué tamaños de k-mer usar según el tipo de datos de la secuencia de entrada.

Anotación directa de genes

Se utilizó servidor de RAST versión 2.0. el cual realiza la anotación de genomas bacterianos y de arqueas. Se identificaron los genes que codifican proteínas, rRNA y tRNA, y se asignaron funciones a los genes.

6.2 Material Biológico

Se trabajó con la cepa clínica Kp003 proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad. Dicha cepa fue aislada de un hemocultivo de un paciente con sepsis neonatal del Hospital El niño Poblano. Asimismo, se trabajó con una cepa tipo ATCC13883 de *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*. Los datos de la cepa ATCC13883 se muestran a continuación:

Tabla 4. Datos de la cepa ATCC 13883

	Descripción
Designación de cepa	NCTC 9633 [NCDC 298-53, NCDC 410-68]
Serotipo	3
Depositado como:	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> (Schroeter)

6.3 Condiciones de crecimiento y mantenimiento de las cepas

En todos los experimentos la cepa de estudio Kp003 y la cepa control ATCC 13883 fueron tomadas del criobanco. Se tomaron 100 µL y se reconstituyó en 5 ml de caldo Luria Bertani (LB), se incubaron a 37°C por 24 horas. Para el mantenimiento en criopreservación de las cepas se tomaron 500 µL del cultivo líquido y fueron colocados en tubos Eppendorf con 500 µL de glicerol al 100% estéril. Se homogenizaron con ayuda de vórtex y se almacenaron en ultracongelador a una temperatura de -70°C.

6.4 Extracción de ADN

Para el aislamiento de ADN se obtuvieron 50 mg de paquete celular de cada bacteria y fue resuspendido en 200 µL de agua destilada esterilizada. Posteriormente se utilizó el Kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep D6005 de ZYMO RESEARCH para la extracción de ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5 Amplificación por PCR

Para la amplificación de los genes del pili tipo IV putativos en *K. pneumoniae*, se utilizaron los primers diseñados en este trabajo. Para su diseño se utilizó la secuencia de *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286 (NC_016845), y se siguieron las siguientes condiciones: un tamaño de 22 pb, un porcentaje de GC <50%. Los primers diseñados se muestran en la tabla 4. En la reacción se empleó ADN genómico como molde usando la mezcla de reacción descrita en la tabla 5. Las condiciones de amplificación se muestran en el Anexo2.

Tabla 5 Primers utilizados en la amplificación de los genes del pili tipo IV

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño de amplicón
<i>pilA</i>	KnT4PpilinF	AACAACGAGGTTTTACCCTGATTGA	423 pb
	KnT4PpilClaR	ACTTCACCCGGAAAACGTCTTCGC	
<i>pilA</i> menor	pilAkbmF	GTC CAG TTG CCG ATA TCG TCA T	369 pb
	pilAkbmR	GGT GGT GAT CGT CAT TCT CGG C	

<i>pilB</i>	pilBkbF	CCA GCA CCC GCA CCA CCT CTT C	1254 pb
	pilBkbR	CAG CTG ATC CCC CTC TGC CGT C	
<i>pilC</i>	pilCkbF	TGG CAT CGC CCA GGT GAA AAA C	1173 pb
	pilCkbR	GTC TCT GGC GCT GGC GCG GTA T	
<i>pilD</i>	pilDkbF	CTA GCC GCG TTA TCG CTG CAC T	782 pb
	pilDkbR	TGC TGC CAG AGA AAA ATA CTC C	
<i>pilM</i>	pilMkbF	CGA CAT GCG TCA TTC CGC CCG C	689 pb
	pilMkbR	CAG AAA CTG GCG GCT TGG AAT G	
<i>pilN</i>	pilNkbF	GCG CGC TCC CGT CAG GGT AAA A	510 pb
	pilNkbR	GTC GTT AAT CTT CTT CCC TGG C	
<i>pilO</i>	pilOkbF	CGC TCA TCT TCC GCC TCC AGC A	418 pb
	pilOkbR	TTA ACC TTC GGG GCG CCT GGA C	
<i>pilQ</i>	pilQkbF	CGA TGG ATA AGC CTG CTG CTT C	1228 pb
	pilQkbR	CCG TGG CGT AAT AAA GAC AAC	
<i>pilT</i>	pilTkbF	GCT GGA AGA AAT CGT AGC CCT T	977 pb
	pilTkbR	AGC GCG CCT GCA GCG ACA CATT	

Tabla 6 Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de genes del pili tipo IV usando ADNg

Reactivos	Volumen para una reacción (µL)
Buffer con MgCl ₂ [10X]	1.25
dNTP's [20mM]	0.25

Primer F [25 mM]	0.25
Primer R [25 mM]	0.25
ADN	0.25
Dream Taq	0.1
Agua destilada estéril	10.15

6.6 Ensayos de movilidad tipo twitching y swarming en *Klebsiella pneumoniae*

Se utilizaron cajas Petri de 90 mm con medio BHI a una concentración del 2% de agar para los ensayos de movilidad tipo twitching y a una concentración de 0.3% de agar para ensayos de movilidad swarming. Para ambos ensayos de movilidad las placas fueron inoculadas por picadura superficial con un asa bacteriológica en punta y se incubaron a 37°C por 48 y 72 horas.

6.7 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de *Klebsiella pneumoniae*

Para la microscopía TEM se utilizaron las cepas Kp003 y ATCC13883 en condiciones de movilidad tipo swarming y twitching a 24, 48 y 72 horas de incubación. De cada placa se tomó una asada y se suspendieron en tubos de 20 µL que contenían una solución fijadora de formaldehído 2%, glutaraldehído 0.5% en 50mM de Cocodilato (7.4 pH), por un tiempo de cinco minutos. Las mezclas de bacteria fueron depositadas en láminas de cobre por 10 minutos y después se lavaron un minuto con agua tridestilada estéril. Cada lámina fue cubierta con 20 µL de ácido fosfotungstico (PTA) al 1% por 10 segundos y finalmente se colocaron en

papel filtro para secar los remanentes de PTA. Las láminas fueron guardadas en celdas y posteriormente se llevaron al Instituto de Ciencias Biomédicas de la UNAM para la obtención de microscopias.

6.8 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN de la cepa Kp003 en condiciones de movilidad tipo swarmig y twitching a 48 y 72 horas de incubación. De cada placa se tomó una asada de todo el halo formado y se suspendió en un tubo con agua destilada esterilizada. Cada tubo fue centrifugado por un minuto a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 μ L de solución A (Anexo 3). Posteriormente, se añadió al mismo tubo 500 μ L de fenol ácido precalentado a 60°C, se mezcló en vortex a máxima velocidad por 20 segundos y se incubó a 60°C durante cinco minutos. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y se pasó la fase líquida de la parte superior a un tubo nuevo. Se añadió 1 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcló en vortex a máxima velocidad, se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Al precipitado se le agregó 1 ml de etanol 70% a temperatura ambiente y fue centrifugado a 12,000 rpm durante 2.5 minutos. El pellet fue resuspendido en 400 μ L de solución A y 1 ml de etanol absoluto, se mezcló nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de etanol 70%, se centrifugó durante 2.5 minutos a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 80 μ L de agua libre de DNAasas y RNAasas estéril para la suspensión del pellet formado.

6.9 Purificación de ARN

Para eliminar los residuos de ADN en el ARN extraído, se hizo la siguiente mezcla (Tabla 7) y se sometió a un periodo de incubación de 1 hora a 37°C. Después del tratamiento con la enzima se realizó un corrimiento electroforético para confirmar que el ARN se mantenía viable. Además se realizó un ensayo de PCR

para amplificar *pilA* utilizando como templado el ARN purificado para descartar la presencia de ADN en la muestra purificada.

Tabla 7 Mezcla de reacción para la purificación de ARN

Componente	Volumen en μL
ARN	20
ADNasa	1
Buffer (10x)	3
Agua	6
Total	30 μL

6.10 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó en dos etapas, la primera consistió en una mezcla de reacción indicada en la tabla 8, la cual se realizó en tubos de PCR con una incubación a 65°C durante cinco minutos.

Tabla 8 Mezcla de reacción inicial para la síntesis de ADNc

Componente	Volumen en μL
ARN	8
Hexámeros	1
Agua	21
Total:	30 μL

Al finalizar la primera etapa, los tubos fueron colocados en hielo y se adicionó 4 μL de Buffer, 1 μL de inhibidor de RNasa y 0.5 μL de la Transcriptasa reversa para un volumen final de 20 μL . Posteriormente cada tubo de reacción se sometió a las

siguientes condiciones: polimerización de 60 minutos a 42°C seguido de inactivación durante 5 minutos a 95°C. El DNAc obtenido se mantuvo a -20°C.

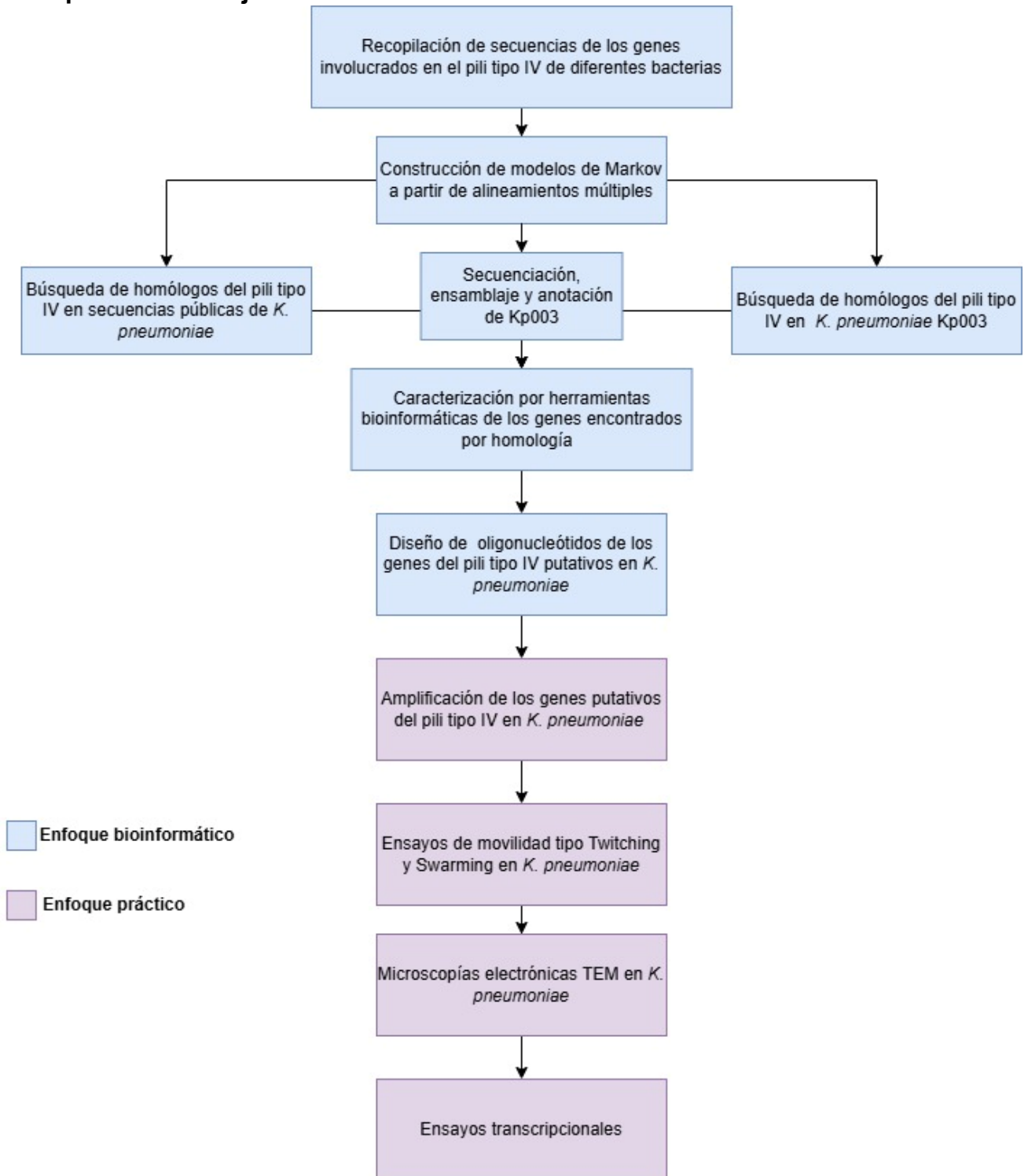
6.12 RT- PCR punto final

El cDNA sintetizado se utilizó como templado para realizar PCR en punto final. Se usó como control positivo la amplificación del gen constitutivo *gyrA*. Se realizó una PCR con gradiente debido a las diferentes T_M 's de cada gen que se amplificó. La mezcla de reacción que se utilizó fue la siguiente (tabla 9).

Tabla 9 Mezcla de reacción para la amplificación de los genes del pili tipo IV con cDNA

Reactivos	Volumen para una reacción
Buffer con MgCl ₂ (10x)	1.25
dNTP's	0.25
Primer F	0.25
Primer R	0.25
cDNA	0.25
Dream Taq	0.1
Agua destilada estéril	10.15

7. Esquema de trabajo



8. Resultados

8.1 Análisis de secuencias públicas

8.1.1 Recopilación de secuencias en la literatura y base de datos

Con la finalidad de investigar si *Klebsiella pneumoniae* tiene los elementos principales para la biogénesis del pili tipo IV se realizó un análisis con herramientas bioinformáticas para la identificación de genes por homología. Se inició buscando en la literatura aquellas bacterias que se ha reportado que poseen pili tipo IVa. Con esto se logró identificar los siguientes microorganismos: *P.aeruginosa* (Alm, R.A., and Mattick, J.S., 1996). *N. gonorrhoeae* (Winther-Larsen et al., 2001). *N. meningitidis* (Kolappan et al., 2016), *M. xanthus* (Treuner-Lange et al., 2020) *H. influenzae* (Bakaletz et al., 2005), *A. baylyi* (Leong et al., 2017b) y *D. nodosus* (Han et al., 2007; Pelicic, 2008). Posteriormente, a través de la base de datos del NCBI se buscaron en los genomas y proteomas de estas bacterias, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cada uno de los elementos principales del pili tipo IVa. Las secuencias de estos genes se buscaron por anotación utilizando BLAST. Finalmente, las secuencias de cada gen del pili tipo IVa de diferentes bacterias se recopilaron en una base de datos, la cual se resume en la tabla 10 y se esquematiza en la figura 8.

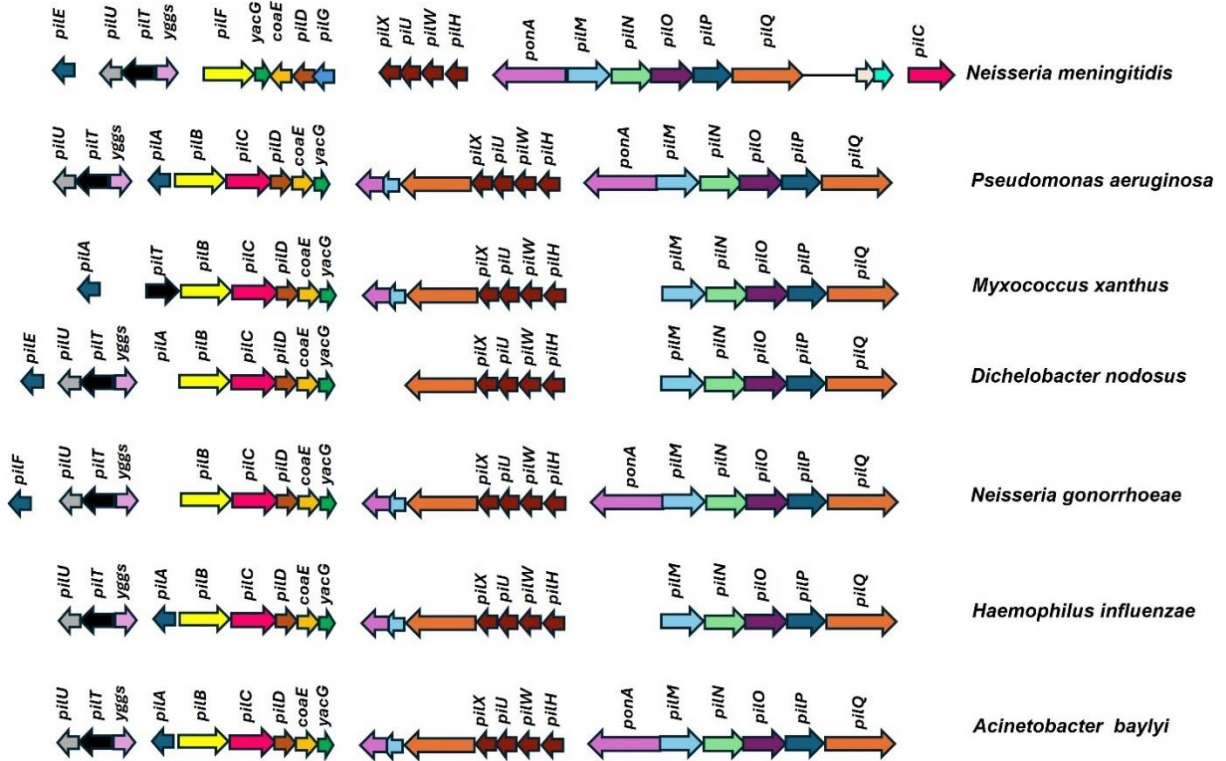


Figura 8 Distribución y organización de los genes que codifican las proteínas de la biogénesis del pili tipo IVa. Todos los genes están dibujados a escala, con la barra de escala representando 1 kb. Los genes centrales de la biogénesis del pili que se encuentran en todas las bacterias Gram-negativas, codifican: una pilina (←), una o varias proteínas similares a la pilina “pilinas menores” (←), una prepilina peptidasa (→), una ATPasa de ensamblaje (→), una proteína de membrana interna (→) y una secretina (→). Genes conservados, algunos genes principalmente de mantenimiento no relacionados con la biogénesis del pili tipo IV como *yggS*, *yacG*, *coaE*, *ispG*, *yfgB*, *ponA*, *aroK* y *aroB*

Tabla 10. Genes de biogénesis del pili tipo IV recopilados de diferentes Microorganismos identificados con pili tipo IVa

ID	Función	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Dichelobacter nodosus</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>
PiIA	Pilina mayor	CP007224.1	DQ166629.1	EU360769.1	AL157959.1	EU836797.1	AY816324.1	KAF238713.8.1
PiIB	ATPasa de ensamble	NP_253216.1	/	QRE85369.1	WP_002221967.1	WP_011555739.1	CAG45766.1	CP054302.1
PiIC	Proteína citoplasmática de anclaje	NC_002516.2	U17138.1	U32588.1	U19580.1	L78131.1	AAX12379.1	/
PiID	Prepilin peptidase	NP_253218.1	AAB65807.1	AAC43468.1	BCT10561.1	AAC36157.1	AAX12380.1	CAG67310.1
PiIM	Proteína accesoria de membrana interna	QSV17786.1	WP_119185439.1	AAB52535.1	EJ42374.1	ABB43054.1	WP_085023210.1	WP_120430767.1
PiIN	Proteína accesoria de membrana interna	NP_253730.1	ABQ13440.1	AAB52534.1	VEJ42373.1	ABB43055.1	/	WP_004923716.1
PiIO	Proteína accesoria de membrana interna	NP_253729.1	ABQ13362.1	AAC43601.1	VEJ38561.1	ABB43056.1	/	WP_004923719.1
PiIP	Proteína accesoria de membrana interna	NP_253728.1	ABQ13908.1	AAC43602.1	VEJ38560.1	ABB43057.1	WP_116967002.1	/
PiIQ	Porina o secretina	NP_253727.1	ABQ13170.1	AAC43603.1	/	AAD04923.1	/	WP_004923730.1
PiIT	ATPasa de retracción	NP_249086.1	AFJ80779.1	AAA25499.1	AAC26823.1	AAT00615.1	/	WP_004922051.1

En la tabla 10 se muestra los genes y las especies que se recabaron para este análisis. Esta recopilación de secuencias se utilizó posteriormente para generar alineamientos múltiples en formato Clustal por cada elemento del pili tipo IV. Por ejemplo, se tomaron todos los genes *pilA* de *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *M. xanthus*, *H. influenzae*, *A. baylyi* y *D. nodosus*, y se realizó un alineamiento múltiple que representa la diversidad de *pilA* en microorganismos conocidos. Este procedimiento se repitió para el resto de los genes que se mostraron en la tabla 10. Los alineamientos se realizaron en la versión web de la herramienta Clustal. Los alineamientos múltiples generados por este servidor se descargaron en formato fasta para posteriormente ser utilizados como archivos de entrada en la construcción de perfiles ocultos de Markov.

8.1.2 Construcción de perfiles ocultos de Markov

Para poder realizar la búsqueda de genes homólogos mediante el software HMMER, se necesitó de la construcción de modelos ocultos de Markov o “perfiles hmm”. Estos modelos de Markov se construyeron implementando el código hmmbuild. Usando alineamientos múltiples como el archivo de entrada se creó un modelo probabilístico en una matriz con la frecuencia de los aminoácidos (figura 9A) o nucleótidos (figura 9B) en cada posición. Estos perfiles hmm fueron construidos para cada uno de los elementos del pili tipo IV.

A

HMM	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L
COMPO	m->m	m->l	m->d	l->m	l->l	d->m	d->d			
1	2.30323 2.68745 0.75406 2.87007 2.68618 0.01714	4.34080 4.41811 1.04344 4.77945 4.42225 4.47059	3.01573 2.77647 1.72988 3.33715 2.77519 5.19294	2.74614 2.72951 2.41561 2.97204 2.73123 0.61958	3.54635 3.46481 0.09356 3.91783 3.46354 0.77255	2.63562 2.40568 0.00000 3.62510 2.40513 0.78342	3.94874 3.72622 *	2.79508 3.29481 4.07072 3.33740 3.72494 0.61035	2.66481 2.67679 2.93382 2.67741 3.29354 0.61035	2.73844 2.69386 2.98164 2.69355 2.67741 2.69355
2	2.90355 2.68618 0.01714	5.02761 4.42225 4.47059	3.37663 2.77519 5.19294	2.75752 2.73123 0.61958	4.31800 3.46354 0.77255	3.68560 2.40513 0.78342	3.77747 3.72494 0.61035	3.69281 3.29354 4.37942	1.92535 2.67741 1.28783	2.41069 2.69355 3.73993
3	2.22400 2.68618 0.01714	4.75206 4.42225 4.47059	3.26105 2.77519 5.19294	2.72468 2.73123 0.61958	4.00679 3.46354 0.77255	3.57089 2.40513 0.78342	3.83333 3.72494 0.61035	3.37203 3.29354 4.17910	2.12616 2.67741 2.51028	2.27397 2.69355 3.65827
4	2.89146 2.68618 0.01714	5.36552 4.42225 4.47059	1.74392 2.77519 5.19294	2.43209 2.73123 0.61958	4.69992 3.46354 0.77255	3.51219 2.40513 0.78342	3.77866 3.72494 0.61035	4.17910 3.29354 4.37942	2.51028 2.67741 1.28783	3.65827 2.69355 3.73993
5	3.34994 2.68618 0.01714	5.52999 4.42225 4.47059	3.81686 2.77519 5.19294	3.04551 2.73123 0.61958	5.07130 3.46354 0.77255	3.95320 2.40513 0.59446	3.80294 3.72494 0.80266	4.37942 3.29354 5.35382	1.28783 2.67741 4.76859	3.73993 2.69355 4.89486
6	3.70071 2.68618 0.01591	5.35858 4.42225 4.54482	4.50240 2.77519 5.26717	4.50279 2.73123 0.61958	5.53801 3.46354 0.77255	0.17844 2.40513 0.68358	5.52557 3.72494 0.70281	5.35382 3.29354 2.70870	4.76859 2.67741 4.53612	4.89486 2.69355 1.86060
7	3.63530 2.68618 0.01591	4.94700 4.42225 4.54482	5.19294 2.77519 5.26717	4.70648 2.73123 0.61958	1.11272 3.46354 0.77255	4.74281 2.40513 0.68358	4.62508 3.72494 0.70281	2.70870 3.29354 4.11338	4.53612 2.67741 3.63863	1.86060 2.69355 3.82526
8	2.54709 2.68618 0.01591	4.48761 4.42225 4.54482	3.91136 2.77519 5.26717	3.62239 2.73123 0.61958	4.71262 3.46354 0.77255	3.27017 2.40513 0.68358	4.64970 3.72494 0.70281	4.11338 3.29354 2.69033	3.63863 2.67741 3.84981	3.82526 2.69355 1.00535
9	1.61065 2.68618 0.01591	4.61726 4.42225 4.54482	4.41983 2.77519 5.26717	3.98814 2.73123 0.61958	3.64046 3.46354 0.77255	3.96172 2.40513 0.68358	4.70087 3.72494 0.70281	2.69033 3.29354 2.67741	3.84981 2.67741 2.69355	1.00535 2.69355 2.69355

B

HMM	A	C	G	T			
COMPO	m->m	m->l	m->d	l->m	i->l	d->m	d->d
1	1.39164 1.18191 1.03804 1.43059 1.38629	1.44513 2.52673 1.02657 1.49897 1.38629	1.35025 1.18191 1.24538 0.96191 1.38629	1.36085 1.18191 1.10777 1.86234 1.38629	0.40092 4 g	0.00000 -	*
2	0.03425 2.41575 1.38629	4.08426 0.90058 1.38629	4.08426 2.54778 1.38629	1.46634 0.85305 1.38629	0.26236 5 t	3.24267 -	0.03984
3	0.03425 2.19803 1.38629	4.08426 2.42244 1.38629	4.08426 0.57679 1.38629	1.46634 1.43278 1.38629	0.26236 7 g	3.24267 -	0.03984
4	0.03425 1.03891 1.38629	4.08426 1.21966 1.38629	4.08426 2.20909 1.38629	1.46634 1.42284 1.38629	0.26236 8 a	0.51611 -	0.90842
5	0.02752 1.33407 1.38629	4.29971 1.57993 1.38629	4.29971 2.20701 1.38629	1.46634 0.86613 1.38629	0.26236 9 t	2.42672 -	0.09247
6	0.02752 1.52054 1.38629	4.29971 1.11329 1.38629	4.29971 1.53560 1.38629	1.46634 1.43715 1.38629	0.26236 10 c	2.42672 -	0.09247
7	0.02752 1.05872 1.38629	4.29971 1.25244 1.38629	4.29971 1.51969 1.38629	1.46634 1.90707 1.38629	0.26236 11 a	2.42672 -	0.09247
8	0.02752 0.46614 1.38629	4.29971 1.55497 1.38629	4.29971 2.68824 1.38629	1.46634 2.37104 1.38629	0.26236 12 a	2.42672 -	0.09247
9	0.02752 0.02752	4.29971 4.29971	4.29971 4.29971	1.46634 1.46634	0.26236 0.26236	2.42672 2.42672	0.09247 0.09247

Figura 9 Perfil oculto de Markov. Imagen representativa del perfil construido con el código hmmbuild en HMMER. La matriz generada representa la puntuación obtenida por cada nucleótido presente o ausente en el alineamiento de secuencias correspondiente a cada gen.

8.3 Búsqueda de homólogos de genes y proteínas en diferentes genomas de *Klebsiella pneumoniae*

Para este estudio se utilizaron las secuencias genómicas y proteómicas de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286 (NC_016845), NTUH-K2044 (NC_012731.1) y FDAARGOS_775 (NZ_CP040993). Estas secuencias fueron seleccionadas por pertenecer a la subespecie *pneumoniae*, y se encuentran validadas por el Refseq del NCBI, lo que garantizó que su anotación fuera confiable para realizar este análisis. La búsqueda de genes homólogos del pili tipo IV en *Klebsiella pneumoniae* se efectuó con los códigos *hmmsearch* y *nhmmer* del software HMMER. Se decidió utilizar dos comandos debido a que el algoritmo de *nhmmer* solo puede leer secuencias de nucleótidos, mientras que *hmmsearch* procesa exclusivamente secuencias de aminoácidos. Para la implementación de estos códigos se utilizó como archivo de entrada los perfiles *hmm* construidos previamente y las secuencias de genómicas y proteómicas de *K. pneumoniae*.

Como resultado se obtuvieron todos los posibles Hits con homología enlistados en orden descendente de acuerdo con el nivel de e-value y score. Esto se realizó por cada uno de los elementos del pili tipo IV (p. ej. *pilA*, *pilB*, etc.). Además, por cada Hit, HMMER reportó las coordenadas del ORF en las que se encontró la mayor similitud. Se observó más de un Hit por cada elemento del pili con un e-value menor a 0.001. Los resultados por debajo de este e-value se consideraron confiables, de acuerdo con lo establecido en el software utilizado. Las figuras 9,10, y 11 son una representación gráfica de los resultados obtenidos con los códigos implementados en el programa HMMER. Además, se muestra el total de Hits que el programa reportó con su respectivo e-value.

Para las tres secuencias de *K. pneumoniae* HS11286, NTUH-K2044 y FDAARGOS_775 (esta última proveniente de una cepa ATCC13883) se observó que algunos de los Hits se encontraban formando pequeños grupos distribuidos a lo largo del genoma (figuras 10, 11 y 12). Esta distribución se observó tanto en la búsqueda con las secuencias homólogas a partir de nucleótidos como de aminoácidos. Es importante mencionar que la formación de varios clusters a lo largo

del genoma de la bacteria se ha observado en otras especies reportadas con pili tipo IVa, entre las que se encuentran *P. aeruginosa*, *M. xanthus* y *N. meningitidis*.

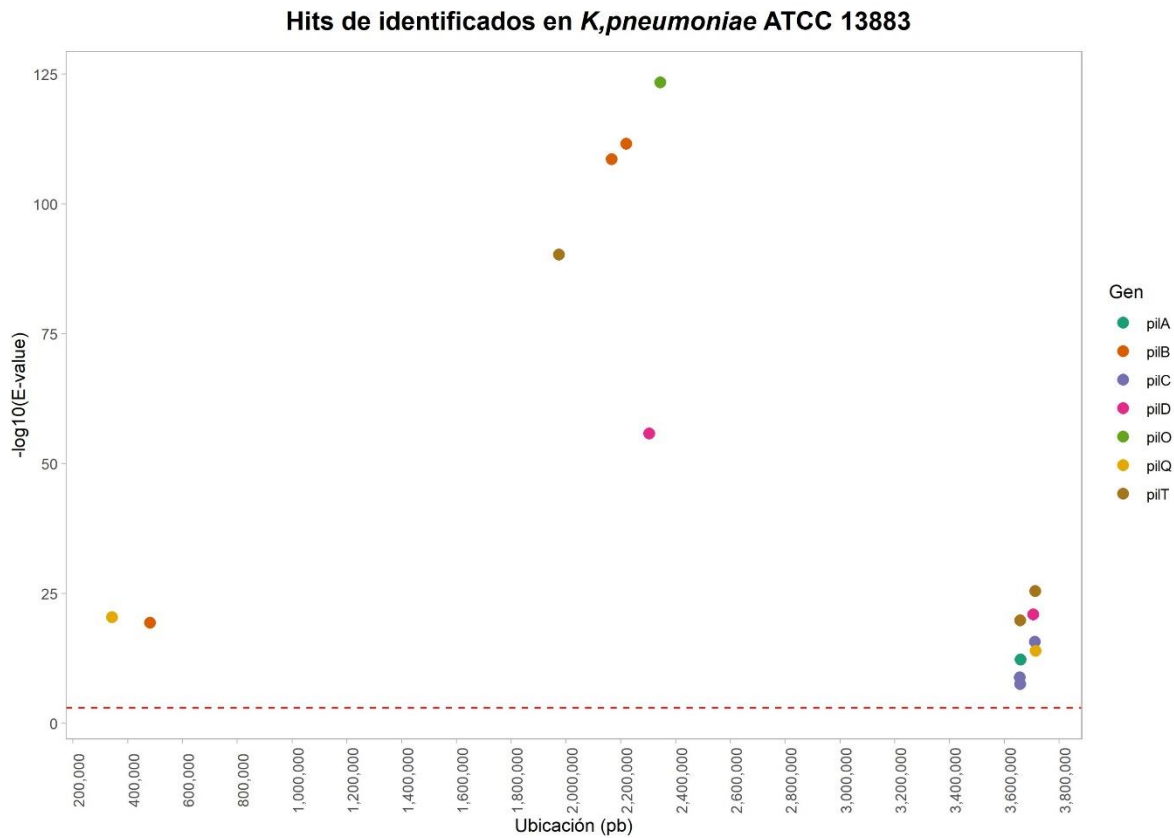


Figura 10 Hits encontrados en la secuencia genómica de *K. pneumoniae* ATCC13883. Eje de abscisas (X) representa la ubicación de los Hits en el genoma. Eje de ordenadas (Y) los valores de E-value por cada Hit. Los valores de E-value fueron transformados con la función $-\log_{10}$. La línea roja punteada indica el valor mínimo para considerar un resultado confiable (E- value: ≤ 0.001).

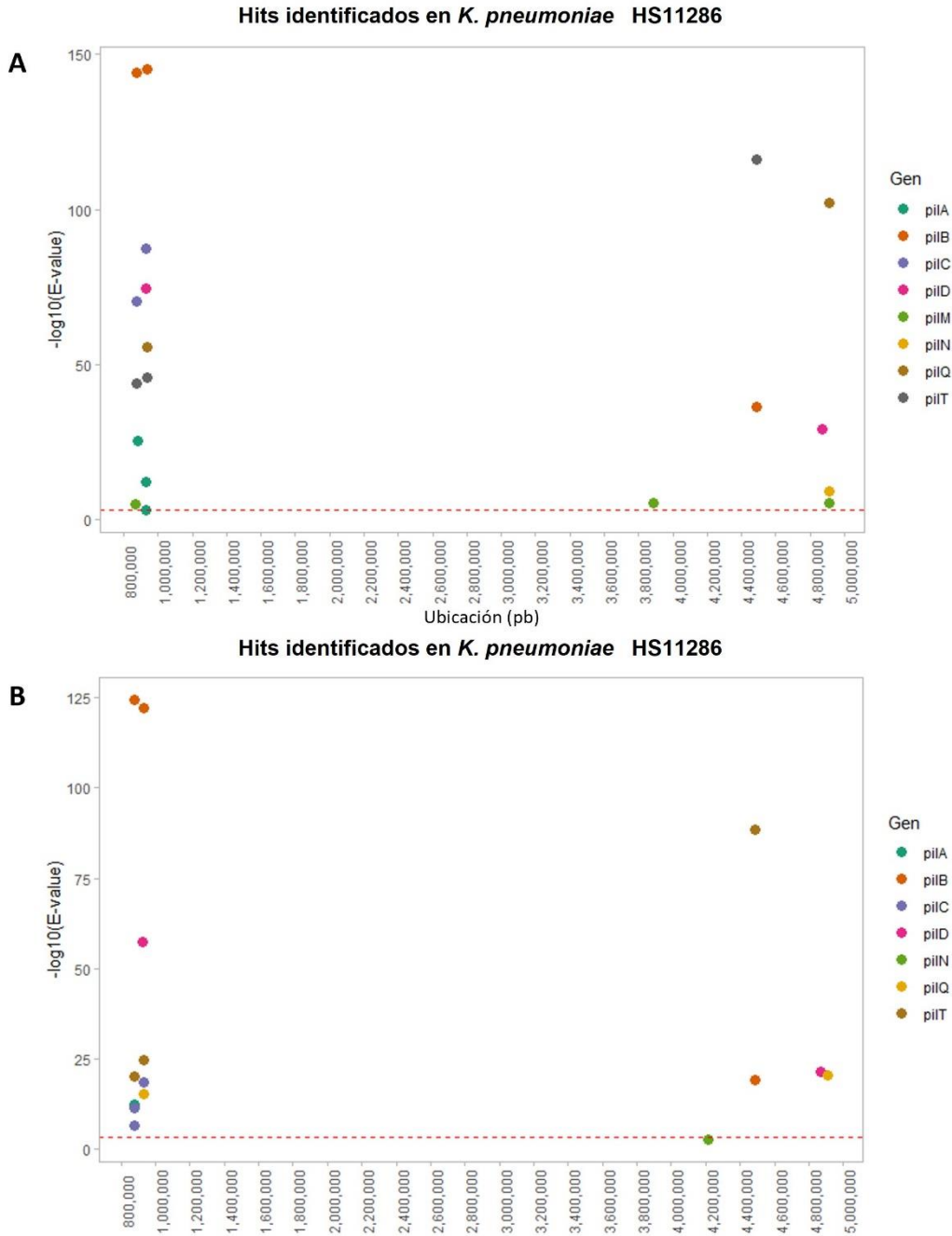


Figura 11 Hits encontrados en *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286. Ubicación de los hits en la secuencia genómica (A) y proteómica (B) de *K. pneumoniae* HS11286. A la derecha se muestra el color correspondiente para cada elemento del pili tipo IV encontrado. El eje X representa la localización de los Hits en el genoma y el eje Y los valores de E-value transformados. La línea roja punteada indica el valor mínimo para considerar un resultado confiable (E- value: ≤ 0.001).

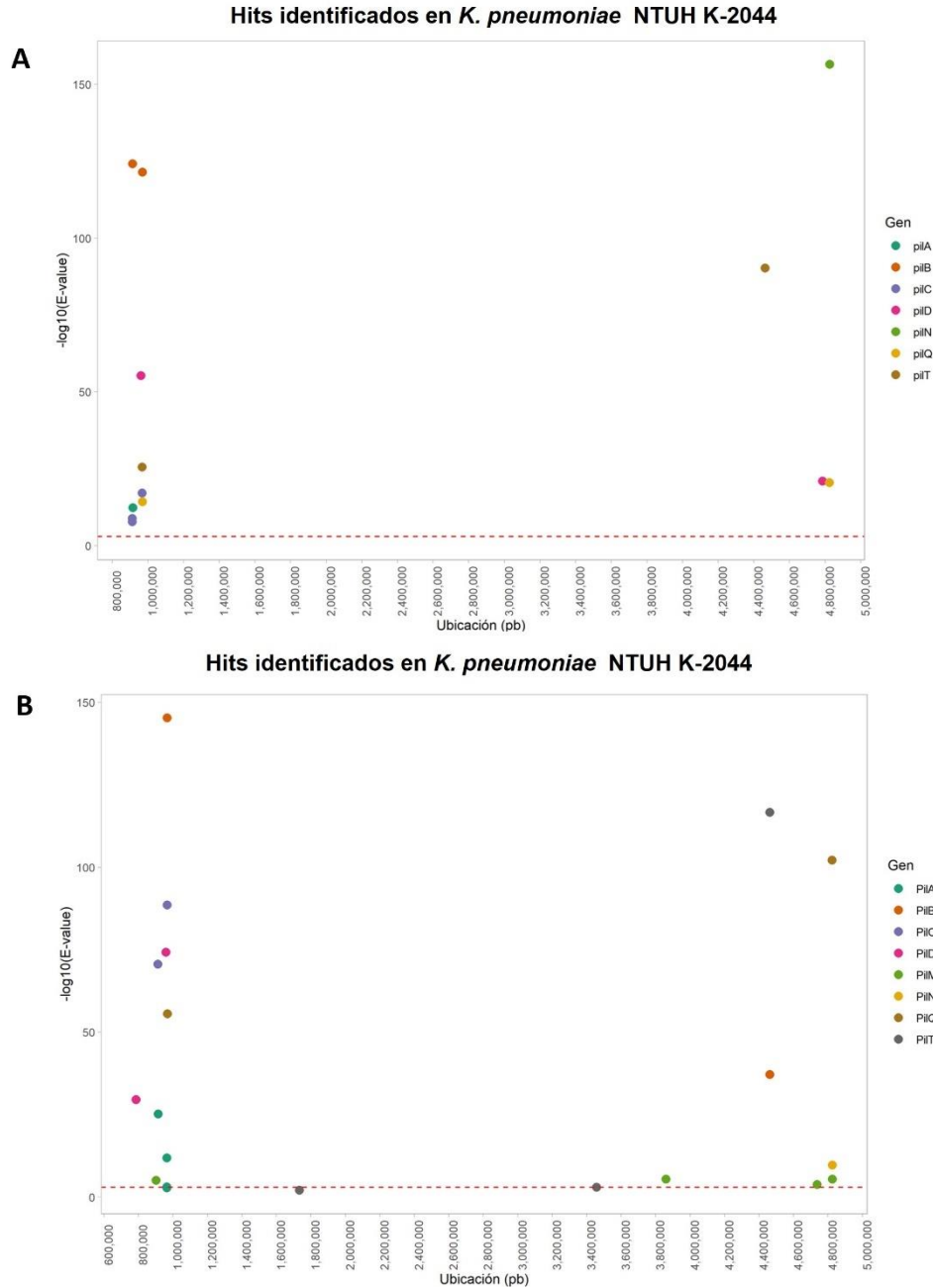


Figura 12 Hits encontrados en *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* NTUH. Ubicación de los hits en la secuencia genómica (A) y proteómica (B) de *K. pneumoniae* NTUH. A la derecha se muestra el color correspondiente para cada elemento del pili tipo IV encontrado. El eje X representa la localización de los Hits en el genoma y el eje Y los valores de E-value transformados. La línea roja punteada indica el valor mínimo para considerar un resultado confiable (E-value: ≤ 0.001).

De acuerdo con lo reportado en HMMER, para las secuencias de *K.pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286 y ATCC 13883, se encontraron homólogos para la mayoría de los elementos del pili tipo IV buscados. Sin embargo, no se identificó ningún resultado para el gen *pilP*, encargado de codificar una de las proteínas accesorias del cuerpo basal del pilus. Lo anterior puede deberse a la variabilidad en la secuencia de este gen, o a su ausencia en los genomas de HS11286 y ATCC13883. Por otro lado, en *K. pneumoniae* NTUH el programa no reportó ningún hit para los genes: *pilO* y *pilP*. A partir de estos resultados se eligieron los primeros tres Hits con menor e-value de cada uno de los elementos del pili tipo IV. Posteriormente se obtuvo su secuencia de aminoácidos y nucleótidos del ORF correspondiente a cada Hit para continuar con la búsqueda de candidatos.

8.4 Caracterización de los genes homólogos encontrados que participan en el pili tipo IV en diferentes genomas de *Klebsiella pneumoniae*

Con la finalidad de escoger a los mejores genes candidatos del pili tipo IV de *K. pneumoniae* se decidió analizar a los Hits obtenidos con el programa de HMMER, descritos en el párrafo anterior. Los ORF's de los tres Hits con menor e-value de cada elemento del pili tipo IV fueron analizados con diferentes plataformas bioinformáticas. Para esto se utilizó la secuencia aminoacídica de los elementos del pili tipo IV encontrados en las secuencias de *K. pneumoniae*. En estos programas se buscó predecir la función, localización y motivos proteicos de cada homólogo identificado. Los Hits correspondientes a la pilina mayor del pili fueron sometidos al programa Pilfind Server, que predice péptidos señal de pilina tipo IV y sus sitios de escisión de la prepilina peptidasa. El algoritmo detectó el mismo motivo transmembranal (GFTLIELMVVIGIILSAI) para las secuencias de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286, NTUH-K2044 y FDAARGOS_775. Este motivo contiene el sitio de escisión Glicina-Fenilalanina que reconoce la prepilin peptidasa, y que corresponde a pilinas de tipo IVa. También, se realizó un alineamiento con estas secuencias y las pilinas tipo IVa de *P. aeruginosa* y *N. meningitidis* (figura 13). Se observó que todas las secuencias compartían la presencia del péptido señal

corto, el sitio de corte “GF” y las tirosinas en las posiciones 24 y 27. Las secuencias también se subieron a las plataformas de Interpro y cello. Se identificó que estas proteínas tienen una localización de tipo extracelular, presentan un dominio de metilación N-terminal tipo prepilina. Con este análisis se confirmó que las secuencias analizadas sí corresponden a pilinas del pili tipo IVa.

Por otro lado, para el análisis de las demás proteínas del pili identificadas en *K. pneumoniae* se utilizaron las secuencias de aminoácidos de cada elemento del pili tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria meningitidis* para un análisis comparativo. En la figura 14 se muestran las características que comparten los Hits de proteínas encontrados en los diferentes proteomas de *K. pneumoniae*. Al menos un Hit por cada proteína del pili tipo IV presentó todas las características de las proteínas del pili tipo IV de *P. aeruginosa* y *N. meningitidis*. Se observa que el Hit1 es el que presentó los mismos dominios y fue clasificado en la misma familia de proteínas, con excepción del Hit2 de PilC de *K. pneumoniae* HS11286. Asimismo, al comparar los resultados de la localización subcelular, se obtuvo la misma ubicación para las pilinas de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *N. meningitidis*. Con estos resultados observados se eligió a los Hit1 de todos los elementos del pili tipo V, con excepción de pilC, donde se tomó la secuencia del Hit2 de *K. pneumoniae* HS11286 para hacer el diseño de oligonucleótidos. . Durante la búsqueda de homologos putativos del pili tipo IV, se encontraron dos Hits que tienen el dominio de una pilina mayor, debido a su tamaño se decidió denominarla como pilina menor y darle la anotación de pilX



Figura 13 Alineamiento de las pilinas mayores (pilA) identificadas en secuencias de *K. pneumoniae*. El alineamiento se realizó con la secuencia de las pilinas mayores de *P. aeruginosa* y *N. meningitidis*. Residuos G-F se encuentran enmarcados en azul. Los rectángulos negros encierran las Tirosinas conservadas 24 y 27 y sombreado con amarillo el motivo transmemembranal.

Familia/Dominio		N.Meningitidis	P.aeruginosa	K.pneumoniae HS11286			K.pneumoniae ATCC			K.pneumoniae NTUH		
				Hit1	Hit2	Hit3	Hit1	Hit2	Hit3	Hi1	Hi2	Hi3
PIIA	Familia: Pilina de proteína fimbrial											
	Sitio de metilación procariotico N-terminal											
	Dominio: Metilación N-terminal tipo prepilina											
PIIB	Familia: ATPasa de ensamblaje											NA
	Dominio: AAA + ATPase											NA
	Superfamilia homologa: P-loop											NA
PIIC	Familia: GspF/pilC											NA
	Dominio: GspF											NA
	Sitio conservado PilC											NA
PID	Familia: Peptidasa lider de tipo IV											NA
	Dominio: Peptidasa											NA
	Sitio conservado de procesamiento de péptidos lider (prepilinas)											NA
PIIQ	Familia: Secretina de pilus tipo IV											NA
	Dominio: Secretina											NA
	Sitio conservado: Proteína del sistema de secreción tipo II											NA
PIIT	Familia: Proteína de retracción PilT/PilU											
	Dominio: ATPasa											
	Dominio: Proteína del sistema de secreción tipo II/IV											
PIIN	Familia: Proteína fimbrial de ensamblaje											NA
	Dominio Citoplasmático											NA
PIIM	Familia: pilM de membrana interna											NA
PIIO	Componente de membrana interna del pili tipo IV											NA
	Dominio citoplasmático											NA

Figura 14 Características de los hits de aminoácidos de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286 (NC_016845), NTUH-K2044 (NC_012731.1) y ATCC 13883 (NZ_CP040993). Análisis comparativo entre las pilinas de *P. aeruginosa*, *N. meningitidis* y los hits identificados para cada gen implicado en la biogénesis del pili en *K. pneumoniae*. Los recuadros en azul son los hits analizados que comparten las familias y dominios presentadas en las pilinas de *P. aeruginosa* y *N. meningitidis*. Los recuadros en rojo indican la falta de estas particularidades. Cuadros en blanco indican la ausencia de hit.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS GENERADAS EN NUESTRO GRUPO

8.5 Ensamblaje de Kp003

Con el objetivo de conocer si los genes identificados en secuencias públicas de *K. pneumoniae* se encontraban en el genoma de la cepa clínica Kp003 se mandó a secuenciar por el método de Illumina NextSeq 2000. Las lecturas obtenidas de la secuenciación del genoma completo de Kp003 se ensamblaron mediante el servidor de acceso libre K-base. Los resultados del ensamblaje se resumen en la tabla 11 donde se observa que el ensamblaje obtenido es confiable ya que se obtuvo un número de contigs de 49 y un N50 de 175651. Posteriormente, se analizó la secuencia obtenida del ensamblaje con las herramientas de la plataforma del Centro de Epidemiología Genómica DTU. Para verificar que la cepa Kp003 pertenece a la especie de *Klebsiella pneumoniae*, se analizó en el servidor de SpeciesFinder del DTU y en el servidor de Pathogenwatch. Los resultados mostraron que la cepa Kp003 es una *Klebsiella pneumoniae*, que pertenece a la secuencia tipo 14 (ST14). La predicción de genes housekeeping indicó que Kp003 presenta a *gapA*, que codifica para la proteína gliceraldeido 3-fosfato deshidrogenasa A. El factor de iniciación de la traducción IF-2beta "*infB*", malato deshidrogenasa "*mdh*", glucosa-6-fosfato isomerasa "*pgi*", porina de membrana externa *phoE*. La subunidad beta de la ARN polimerasa *rpoB* y la subunidad TonB del complejo Ton *tonB*. Además presenta el serogrupo capsular K2 y el antígeno O1 (figura 15). Ambos serogrupos se han descrito en cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumonia* (Kphv). K2 es el serogrupo más frecuente en los aislamientos de pacientes con neumonía, bacteriemias e ITU. El antígeno O contribuye al incremento de la bacteriemia y adhesión de Kphv a las células (Amraie H et al., 2014; Gu D., 2016).

Tabla 11 Datos de ensamblaje de la cepa Kp003

Datos de ensamblaje		Kp003
Tamaño del genoma	5,399,770 pb	
Número de contigs	49	
N50	175651	
Contenido de GC (%)	57.43	
Número de secuencias codificadas	5252	

A

Species	Match	Confidence of result
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LGJY01000007	PASS

B

Resultado de MLST : **ST14**

Perfil

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB
14	1	6	1	1	1	1	1

C

Predicción de capsula(K) y serotipo O

K locus	Predicted capsule type	Confidence
KL2	K2	Very high
O locus	Predicted O type	Confidence
O1/O2v1	O1	Very high

Figura 15 Clasificación y caracterización de la secuencia ensamblada de Kp003. (A) Resultado del análisis realizado en SpeciesFinder. (B) Clasificación taxónomica y número de genes alélicos housekeeping, “glyceraldeido 3-fosfato deshidrogenasa A” (*gapA*). El factor de iniciación de la traducción IF-2beta (*infB*), malato deshidrogenasa (*mdh*), glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*), porina de membrana externa (*phoE*). La subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) y la subunidad TonB del complejo Ton (*tonB*). (C) Clasificación de acuerdo con los antígenos capsular y somático detectados. Los resultados mostrados en B y C fueron obtenidos en el servidor Pathogen watch (C) Clasificación de acuerdo con los antígenos capsular y somático detectados. Los resultados mostrados en B y C fueron obtenidos en el servidor Pathogen watch.

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos en SpeciesFinder, y determinar a qué subespecie pertenece Kp003 se realizó un análisis filogenético. Debido a la importancia y prevalencia de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* en el área hospitalaria, se decidió hacer el análisis con esta subespecie. Este análisis fue realizado mediante el servidor BV-BRC y se ejecutó utilizando una colección de genomas provenientes del NCBI, donde se seleccionaron únicamente secuencias del RefSeq. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16. En el árbol filogenético se observó que Kp003 está relacionada con *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 43816 soportado por un Bootstrap de 1000 rondas

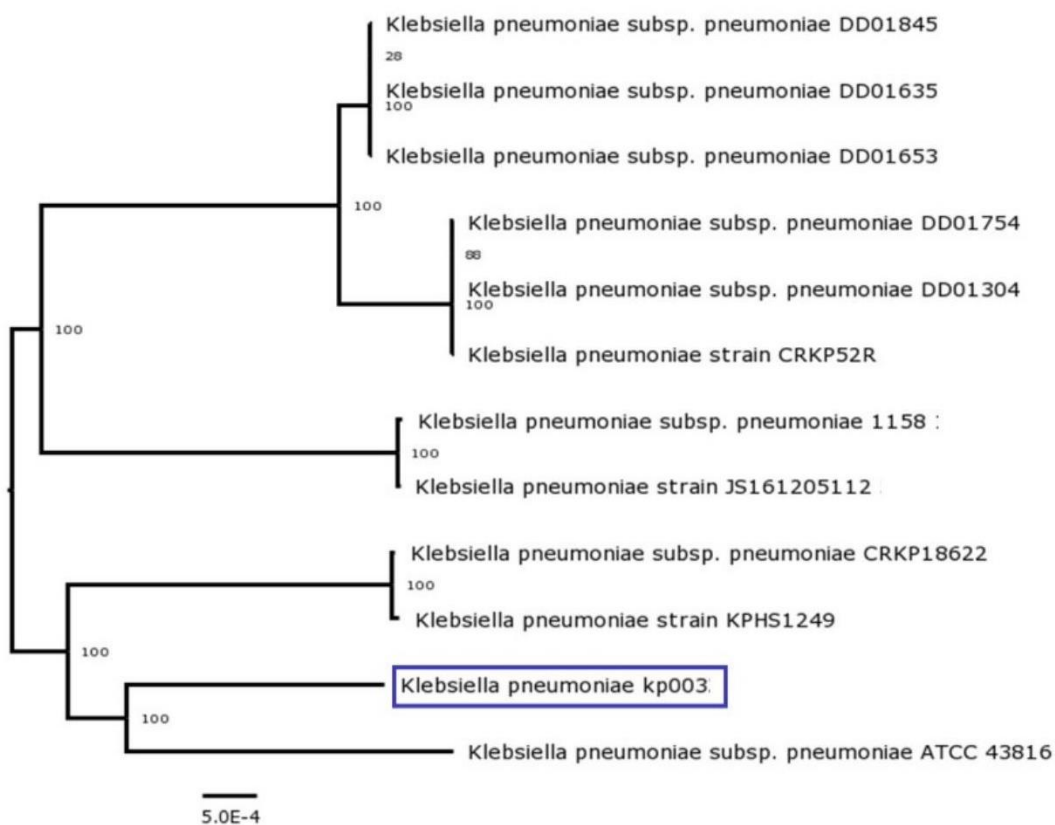


Figura 16 Árbol filogenético de Kp003 y secuencias de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*. Análisis evolutivo por el método Codon Tree. La historia evolutiva se infiere seleccionando PGFams BV-BRC de copia única y analizando proteínas alineadas y ADN codificante de genes de copia única utilizando el programa RAXML. La barra representa la divergencia de secuencia de $5,0E^{-4}$ nucleótidos.

8.6 Anotación y búsqueda de genes de virulencia en Kp003

La anotación del genoma ensamblado se realizó mediante el servidor de RAST por predicciones de genómica comparativa. El archivo de anotación final de RAST, informó un total de 5,434 ORFs y 108 ARNs (ARNt y ARNr) distribuidos en los 49 contigs. Además, se obtuvo la clasificación en subsistemas de acuerdo con la función metabólica de los posibles ORF detectados. A partir de la secuencia anotada en RAST se realizó una búsqueda para encontrar genes de virulencia la plataforma fidBac. Inicialmente, esta plataforma reportó la presencia de cuatro de los cinco genes que codifican a las fimbrias tipo III (*mrkABCD*). Sin embargo no se encontraron resultados para el gen *mrkF*, el cuál codifica para la proteína de subunidad menor de la fimbria tipo III. Así como la presencia de *fimD*, *fimI* y *fimH*, correspondientes a los genes del pili tipo I, y genes componentes del sistema de secreción tipo 6 (T6SS). También se encontró la presencia de genes involucrados en la producción del sideróforo enterobactina (tabla 12). . El hallazgo de los genes de las fimbrias tipo I, II y III coinciden con los genes de virulencia que hasta ahora se han reportado en *K. pneumoniae*. Por otro lado, se encontró en el visualizador de RAST y fidBac los genes: *pulO*, *pulN*, *pulL*, *pulK*, *pulJ*, *pulI*, *pulH*, *pulG*, *pulF* y *pulE*, correspondientes al sistema de secreción tipo 2. Hasta ahora estos genes sólo han sido reportados en *Klebsiella oxytoca*, y se ha reportado que comparten una alta homología con las pilinas de tipo IV. . El conjunto de resultados obtenidos en este análisis puede consultarse en el siguiente link:

http://fbac.dmicrobe.cn/tools/report/pipe/task_result&jobid%3D2023042823623115r3yD/

Tabla 12 Factores de virulencia anotados en Kp003

Gen	Descripción	Función
<i>pulO</i>	prepilina peptidasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulN</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulL</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulK</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulJ</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulI</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulH</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulG</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulF</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>pulE</i>	Proteína de secreción de pululanasa	Proteína del sistema de secreción de tipo II
<i>mrkD</i>	Subunidad de adhesina de fimbria tipo 3	Precursor de la proteína adhesina fimbrial MrkD
<i>mrkC</i>	Proteína usher de la fimbria tipo 3	Proteína de adherencia
<i>mrkB</i>	chaperona de fimbria tipo 3	Proteína de adherencia
<i>mrkA</i>	Subunidad mayor de la fimbria tipo 3	Proteína de adherencia
<i>entE</i>	(2,3-dihidroxibenzoil)adenilato sintasa EntE	Subunidad E de enterobactina sintasa para la adquisición de hierro
<i>entB</i>	2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato sintetasa, isocroismatasa	Adquisición de hierro
<i>entC</i>	isocorismato sintasa	Adquisición de hierro
<i>fepB</i>	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de Fe ²⁺ -enterobactina	Adquisición de hierro
<i>ybdA</i>	Exportador de enterobactina EntS	Adquisición de hierro
<i>fepD</i>	Proteína de membrana transportadora de hierro-enterobactina	Adquisición de hierro
<i>fepG</i>	permeasa transportadora de hierro-enterobactina	Adquisición de hierro
<i>fepC</i>	transportador de hierro-enterobactina proteína de unión a ATP	Adquisición de hierro
<i>entD</i>	enteroquelina sintetasa, componente D	Adquisición de hierro
<i>fimD</i>	Proteína de membrana externa para exportación y ensamblaje defimbrias tipo I	Adherencia
<i>fimH</i>		Adherencia
<i>fimI</i>	Proteína fimbrial de biosíntesis de pilus tipo 1	Adherencia

8.7 Identificación de los genes del pili tipo IV en el genoma de Kp003

La búsqueda realizada en el servidor de fidBac predijo diferentes genes de virulencia en Kp003 (tabla 12), sin embargo, en este servidor no se identificaron genes correspondientes al pili tipo IV. Al realizar la búsqueda mediante el visualizador de RAST Seed se logró encontrar algunos de los genes del pili tipo IV (*pilA*, *pilB*, *pilQ*, *pilT*, *pilM* y *pilN*). La diferencia entre los resultados obtenidos en ambos servidores puede estar relacionado a las secuencias con las que el programa cuenta en su base de datos para realizar la búsqueda. La plataforma de fidBac realiza un control-de calidad con los genomas de las bases de datos pública y los filtra, lo que sugiere que tenga una menor cantidad de genomas disponibles para realizar una anotación por genómica comparativa (Liang et al., 2021). Por otro lado, en Rast Seed se la anotación del genoma se realiza en un entorno que admite la comparación con una integración de cientos de genomas existentes (Aziz et al., 2008).

Por lo anterior se decidió volver a ocupar el software HMMER implementando los códigos utilizados en la búsqueda de genes del pili tipo IV en secuencias públicas de *K. pneumoniae*. La implementación del software HMMER logró identificar los genes correspondientes a *pilC*, *pilD* y *pilO*. Los resultados obtenidos de ambos programas se pueden observar en la figura 18 En esta imagen representativa de la distribución de los genes se observó que estos se encuentran ubicados en todo el genoma formando pequeños clusters, como es el caso de *pilA*, *pilB* y *pilC*; *pilM*, *pilN*, *pilO* y *pilQ*. Además, se realizaron alineamientos con las secuencias de dichos genes y se compararon con los genes de *P.aeruginosa* y *N. meningitidis* para determinar el porcentaje de identidad que comparte con genes del pili tipo IV ya reportados (figura 17).

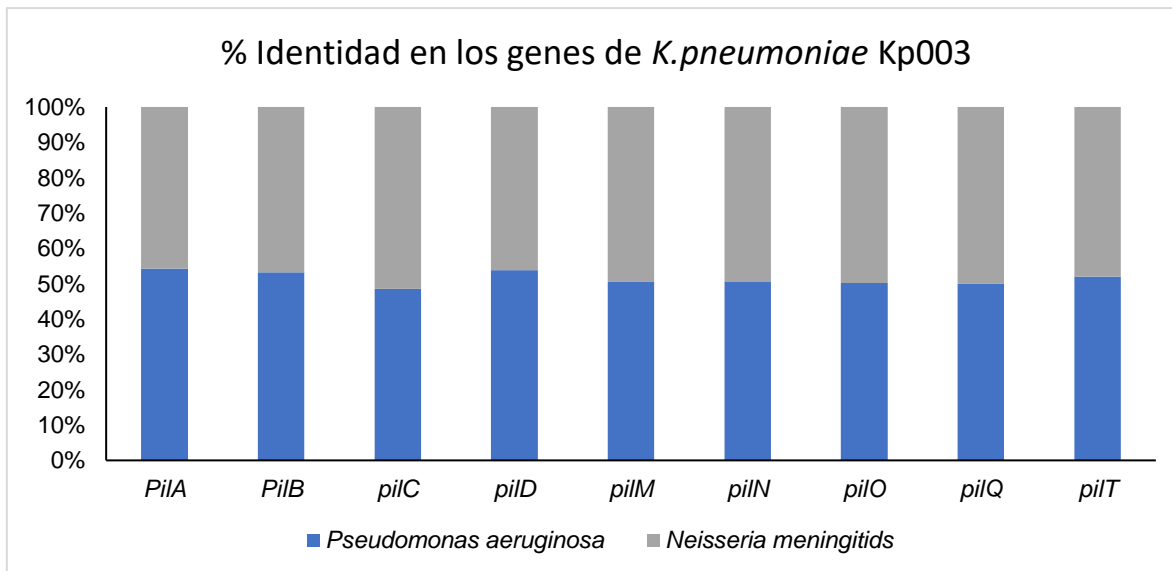


Figura 17 Porcentaje de identidad entre los genes de *K. pneumoniae* (Kp003). Se muestra el porcentaje de identidad (eje Y) que comparten los genes del pili tipo IV de *K. pneumoniae* Kp003 (eje X) con los de *P. aeruginosa* y *N.meningitidis* en color azul y gris respectivamente. Los resultados se obtuvieron por alineación de secuencias por pares (PSA) con la herramienta de EMBOSS Needle del servidor de EMBL-EBI.

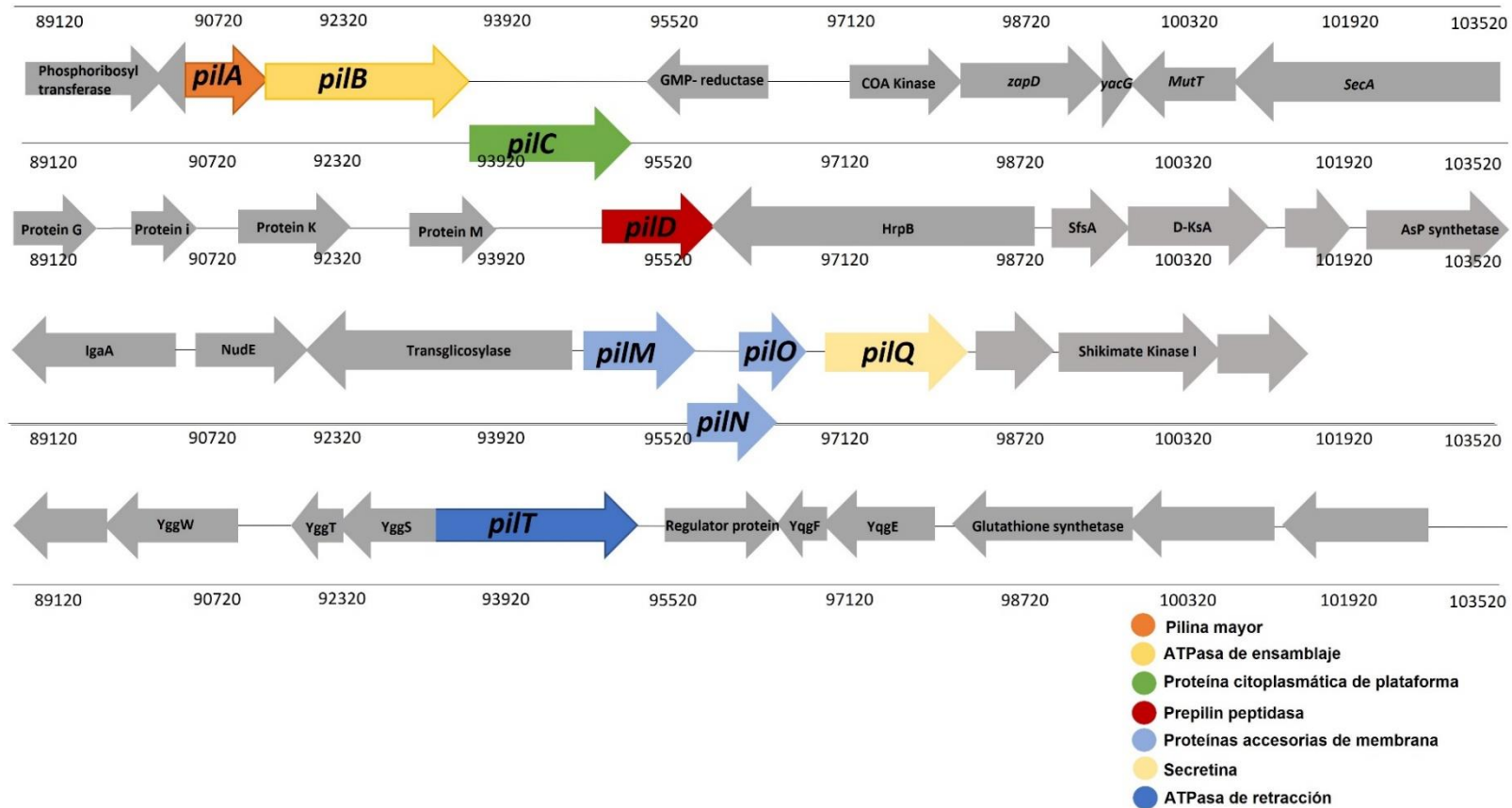


Figura 18 Ubicación de los genes del pili tipo IV encontrados en Kp003. Imagen representativa de los genes putativos del pili tipo IV encontrados después de la secuenciación del genoma de *Klebsiella pneumoniae subs pneumoniae* cepa Kp003. El tamaño de las flechas a escala es proporcional al real. Las flechas grises indican los genes cercanos (contexto genómico) a los ORFs correspondientes del pili tipo IV, representados en diferentes colores según su función.

8.9 Los genes involucrados en la biogénesis del pili tipo IV se encuentran presentes en cepas de *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae* cepa Kp003

Para determinar la presencia de los genes putativos del pili tipo IV encontrados en *Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*, se realizaron PCRs punto final en la cepa de ATCC13883 y Kp003 con los oligos diseñados. En los resultados que se obtuvieron al realizar el corrimiento electroforético del producto de PCR de Kp003, se observó la presencia de amplificado para todos los genes y además con la longitud del amplicón esperado, de acuerdo con lo predicho mediante bioinformática (figura 20A). Sin embargo, en la amplificación realizada con el ADNg de la cepa ATCC13883 no se logró obtener la amplificación de los genes *pilT*, *pilQ* y *pilN* (figura 20B). Cabe mencionar que, estos genes si fueron identificados mediante homología, lo que sugiere que su ausencia puede estar justificada por alguna mutación puntual de una base que es esencial para que los primers diseñados puedan unirse a la secuencia del gen blanco. Además, de acuerdo con la predicción por bioinformática, los amplicones que se obtuvieron de ambas cepas fueron del tamaño esperado, tal y como se muestra en la tabla 13

Tabla 13 Genes amplificados por PCR en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Gen	Tamaño del gen	ATCC 13883	Kp003
<i>pilA</i>	423 pb	✓	✓
<i>pilB</i>	1254 pb	✓	✓
<i>pilC</i>	1173 pb	✓	✓
<i>pilD</i>	782 pb	✓	✓
<i>pilQ</i>	1228 pb	*	✓
<i>pilT</i>	977 pb	*	✓
<i>pilM</i>	689 pb	✓	✓
<i>pilN</i>	510 pb	*	✓
<i>pilO</i>	418 pb	✓	✓
<i>pilX</i>	369 pb	✓	✓

Genes no amplificados (*) Genes amplificados (✓)

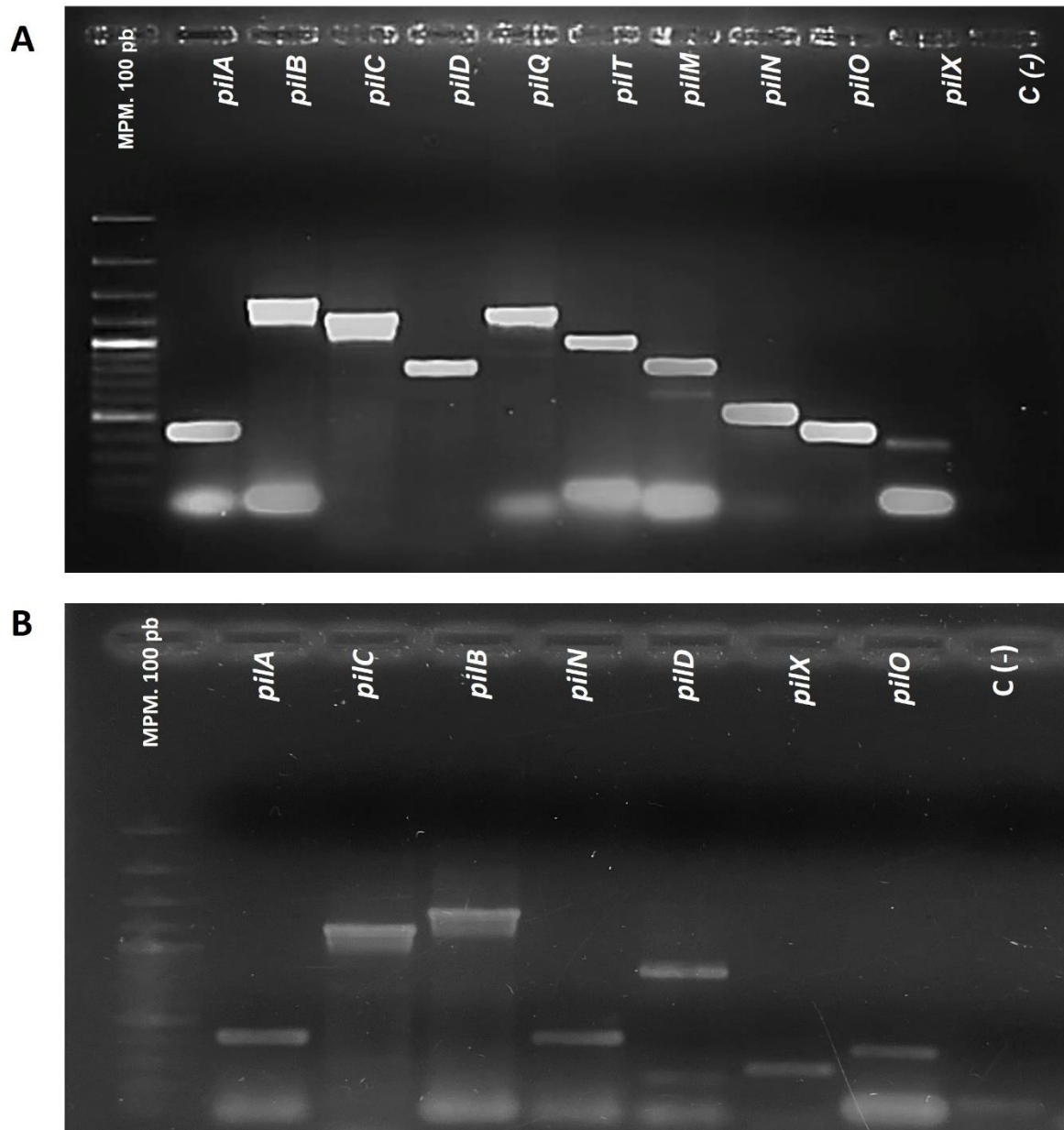


Figura 20 Amplificación de los genes del pili tipo IV putativo de *K. pneumoniae* . (A) Genes amplificados por PCR en Kp003 (B) Genes amplificados en *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC1388. MPM: marcador de peso molecular.

8.10 *Klebsiella pneumoniae* presenta movilidad tipo twitching y swarming

Con la finalidad de evaluar un fenotipo que implique la participación del pili tipo IV, se hicieron ensayos de movilidad tipo twitching con las cepas Kp003 y ATCC13883. En trabajos realizados anteriormente por López-Reynoso (2019) en su tesis de maestría, observó que Kp003 presentaba movilidad tipo twitching en placas con medio BHI al 2% de agar. Por tal motivo y debido a que se observó la amplificación de algunos de los genes del pili tipo IV en *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC13883 se decidió investigar si esta cepa presenta movilidad tipo twitching. Para evaluar este fenotipo se utilizó la misma concentración de agar en medio BHI (2%) y se incubó a 37°C por un periodo de 72 horas, como control positivo se utilizó a Kp003. Los resultados mostraron el crecimiento de la colonia plana, mucoide y extendida que además presenta alrededor la formación de un halo, similar al “vidrio esmerilado”, característico de la movilidad tipo twitching en Kp003, como ya anteriormente se había reportado. Además, presentó un diámetro de 3.4 cm de longitud a las 72 horas de incubación. Por otro lado, la cepa ATCC13883 presentó la formación de un halo denso y mucoide con bordes irregulares y un diámetro de menor longitud en comparación con Kp003. Se ha reportado que los tiempos de incubación influyen en la movilidad tipo twitching. En Kp003 y ATCC 13883 se evaluaron dos tiempos de incubación (48 y 72 horas), se observó que el aumento de movilidad era a las 72 horas y que después de este periodo de incubación la movilidad no presentaba ningún cambio, tal y como se había mostrado por López-Reynoso (2019). Por lo que se consideró que a las 72 horas de incubación es la movilidad máxima. La comparación de ambas cepas ante estos fenotipos se muestra en la figura 21. Al no observarse la formación de halo casi transparente de bordes irregulares y baja densidad en ATCC 13883, nos sugiere que solo en Kp003 se está presentando el fenotipo de twitching.

De igual manera, se realizaron ensayos de movilidad tipo swarming en una concentración de agar del 0.3% para ATCC13883 y Kp003 con el propósito de observar el comportamiento de ambas cepas bajo los dos fenotipos de movilidad.

En la figura 22 se observa la formación de bordes irregulares que se extienden alrededor de la colonia, tal y como se ha observado el fenotipo de swarming en otros modelos de estudio Murray et al. (2010). Posteriormente ambos ensayos de movilidad fueron utilizados como muestra para observar mediante Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM) si los fenotipos observados estaban relacionados al pili tipo IV.

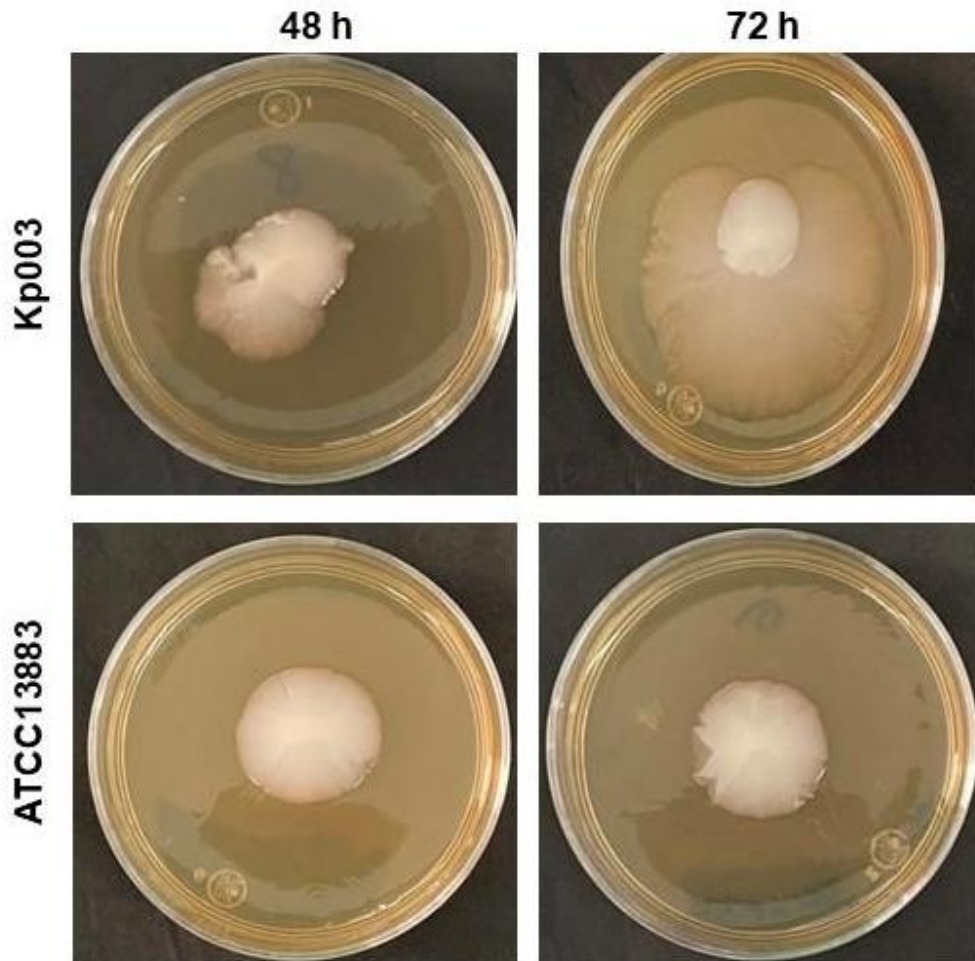


Figura 21 Ensayos de movilidad tipo twitching. Imágenes representativas de los ensayos de movilidad twitching. Estos ensayos se realizaron por triplicado a 37°C de incubación, y a una concentración del 2% de agar en medio BHI.

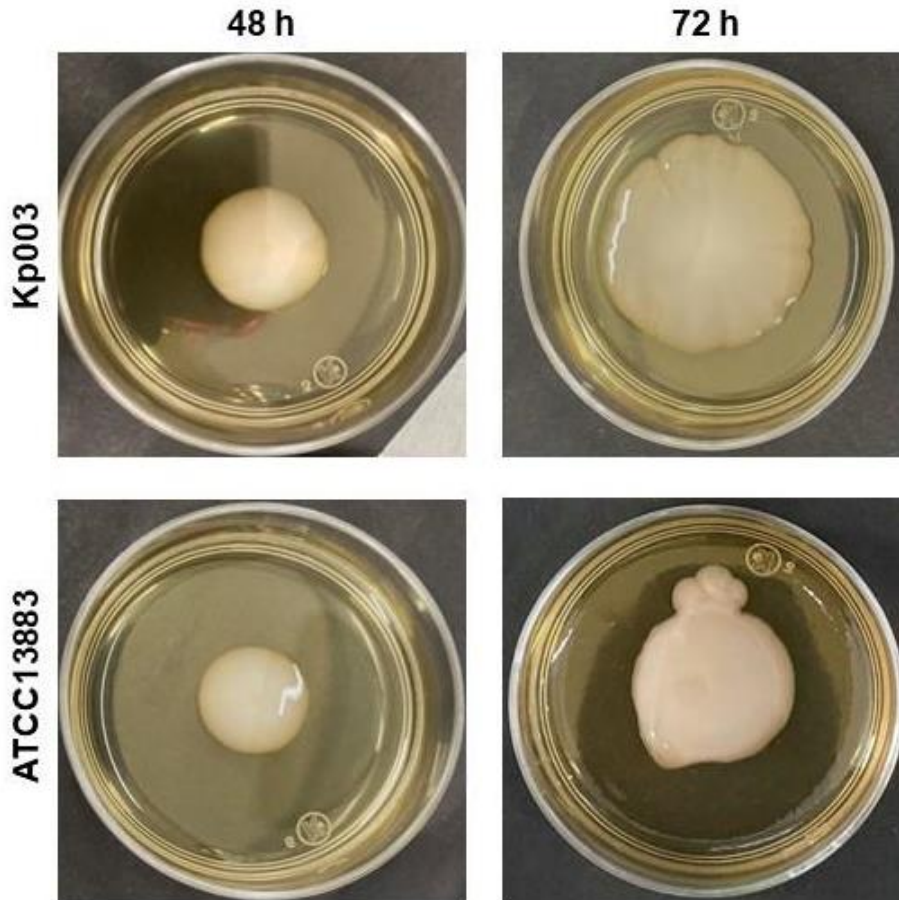


Figura 22 Ensayos de movilidad tipo swarming. Imágenes representativas de los ensayos de movilidad swarming. Estos ensayos se realizaron por triplicado a 37 °C de incubación y en una concentración del 0.3 % de agar en medio BHI.

8.11 Estructuras similares al pili tipo IV se presentan bajo condiciones de movilidad tipo swarming en *Klebsiella pneumoniae*

Muestras tomadas a partir de los ensayos de movilidad tipo twitching y swarming de Kp003 y ATCC13883 fueron utilizadas para realizar microscopía de transmisión electrónica (TEM). En condiciones de movilidad tipo **swarming** con 48 horas de incubación, Kp003 mostró la presencia de estructuras con características similares a las del pili tipo IV. Se observaron filamentos largos de ~6 nm de diámetro en la membrana externa de Kp003, de una longitud mayor a las fimbrias tipo I y III características de *K. pneumoniae* (figura 23). Las micrografías tomadas de los ensayos de movilidad tipo **twitching** de Kp003 no se muestran en este trabajo

debido a que no lograron observarse por problemas en la fijación de las muestras. Por otro lado, en los ensayos con ATCC13883 **no se logró observar la presencia de alguna estructura correspondiente al pili tipo IV** (figura 24). Este resultado obtenido en la cepa de referencia ATCC13883 puede estar relacionado a problemas técnicos derivados de la tinción de las muestras.

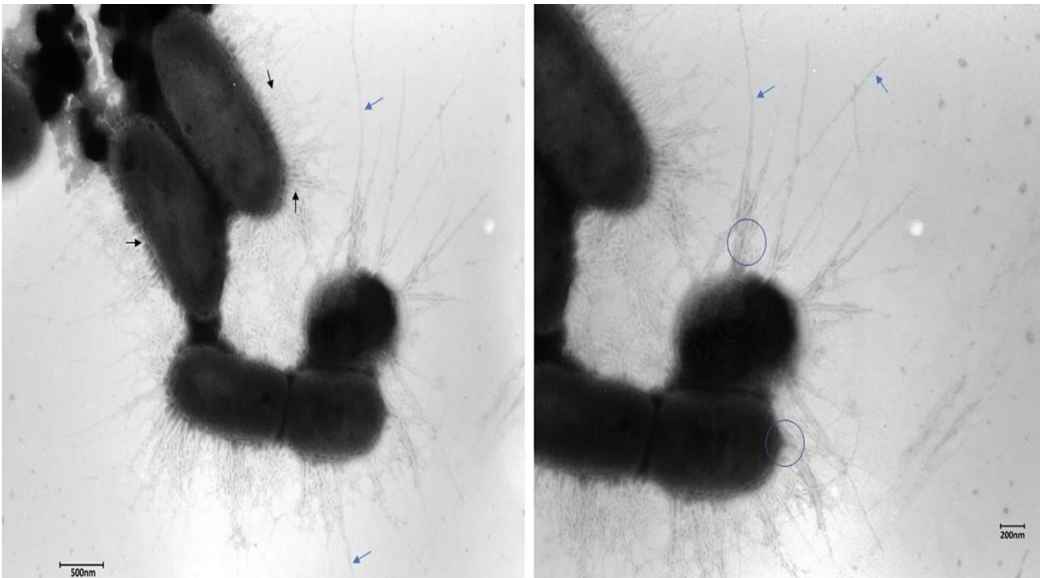


Figura 23 Microscopias electrónica TEM en Kp003. Microfotografías electrónicas de Kp003. Las flechas azules indican filamentos largos similares a los pilus de tipo IV, y los círculos azules muestran filamentos agregados de pilus de tipo IV que emergen de la membrana Kp003. Las flechas negras muestran la presencia de pelos cortos correspondientes al pili tipo 1 y 3 de *K. pneumoniae*.



Figura 24 Microfotografía electrónica TEM de *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC13883. Microscopía realizada bajo condiciones de movilidad swarming a las 48 horas de incubación.

8.12 Expresión de *pilA* y *pilO* bajo condiciones de movilidad tipo swarming en *K. pneumoniae*

A partir del fenotipo observado en las microscopias TEM de Kp003 procedentes de ensayos de movilidad tipo swarming de 48 horas de incubación, se decidió evaluar bajo estas condiciones la expresión de los genes del pili tipo IV. Se realizó la extracción y purificación de ARN para la obtención de cDNA mediante retrotranscriptasa. Del cDNA obtenido se ocupó 0.25 μ L como templado para amplificar los genes de *pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilQ*, *pilT*, *pilM*, *pilN* y *pilO* y de lo que proponemos que es una pilina menor putativa (*pilX*) del pili tipo IV mediante PCR punto final. Se utilizó como control positivo al gen *gyrA*, con la finalidad de corroborar la integridad del cDNA utilizado. El gen constitutivo *gyrA* codifica la subunidad A de la ADN girasa y siempre se está expresando para la replicación del ADN. Para el control negativo se utilizó el ARN tratado con DNasa. Los resultados mostraron amplificación para los genes *pilA*, *pilO* y para *gyrA* (control positivo) y la ausencia de amplificado en el control negativo (figura 25). Los demás genes involucrados en el pili tipo IV no lograron observarse mediante la amplificación. Lo anterior plantea

una pregunta interesante para futuros trabajos: ¿en qué condiciones se expresan el resto de los genes componentes del pili tipo IVa?

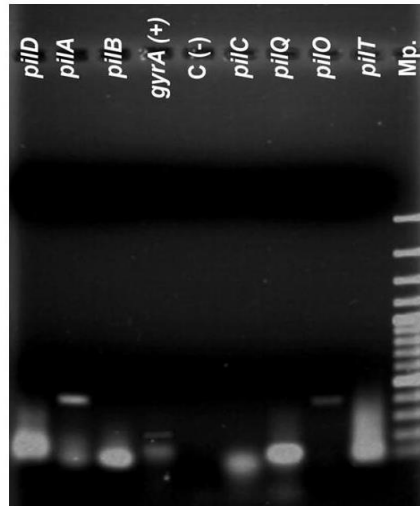


Figura 25 RT-PCR punto final de Kp003. Mp. Marcador de peso molecular de 100 pb. Se utilizó la amplificación del gen *gyrA* con cDNA como templado para el control (+). Como control negativo se utilizó el ARN tratado con ADNasa.

9. Discusión

Anteriormente se observó el fenotipo de movilidad en cepas clínicas de *K. pneumoniae* aisladas de sepsis neonatal, además de la presencia de un apéndice filamentoso similar a un pili tipo IV en la cepa Kp003 (datos no publicados). Recientemente, en el trabajo de maestría de López C (2019) se demostró la presencia y expresión del gen que codifica la subunidad principal del filamento del pili tipo IV (*pilA*) en Kp003. También, que esta cepa clínica posee movilidad tipo Twitching. Estos antecedentes nos llevaron a proponer la existencia de los componentes principales del pili tipo IV en *Klebsiella pneumoniae*: *pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilQ*, *pilT*, *pilM*, *pilN*, *pilO*. A partir de una búsqueda de genes homólogos encontramos que estos genes existen en los genomas públicos de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, así como en el genoma de la cepa Kp003, secuenciado y ensamblado por primera vez para este trabajo. Para esta identificación se partió de una base de datos construida con los genes del pili tipo IVa de diferentes bacterias: *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *M. xanthus*, *A. baylyi*, *H. influenzae* y *D. nodosus*. La búsqueda en HMMER nos permitió hallar los genes homólogos putativos que componen el core principal del pili tipo IV en secuencias públicas de *K. pneumoniae*. Así como en el genoma de la cepa clínica Kp003 secuenciada. Se observó que estos genes putativos comparten una distribución similar a los genes del pili tipo IV de *P. aeruginosa* y *M. xanthus* (Tonjum T. y Koomey T., 1997 y Tammam et al., 2013). Sin embargo, dentro de esta distribución no se identificó al gen *pilP*, el cual se ha reportado que en otras bacterias promueve el ensamblaje del pilus formando un complejo de membrana en conjunto con *pilMNOQ* (Balasingham et al., 2007; (Ayers et al., 2009). La aparente ausencia de *pilP* en los genomas analizados de *K. pneumoniae* puede estar relacionado a que el algoritmo de búsqueda construido no logró identificar algún homólogo para tal gen. Lo anterior puede corresponder a la variabilidad de *pilP* entre las diferentes especies de bacterias que se utilizaron para realizar los alineamientos. Lo anterior fue observado en los alineamientos realizados para este estudio, donde se ve un menor rango de diferencia entre *pilP* del mismo género (*Neisseria*) en comparación con las demás secuencias de *pilP* utilizadas. Aunque el grupo de genes *pilMNOPQ* es uno de los más conservados en las bacterias que producen pili de tipo IVa (Drake et al., 1997;

Balasingham et al., 2007). Se ha reportado que secuencias de *pilP* de diferentes bacterias comparten una identidad de secuencia baja (Tammam et al., 2011). Por lo que para su identificación ha sido a nivel proteómico mediante el modelado de la proteína o a través de técnicas moleculares como Western blot. Se ha observado que a nivel estructural existe una alta similitud entre PilP de Kp003 y las PilP de otras bacterias con pili tipo IVa (Tammam et al., 2013). Al ser PilP importante en la interacción con PilO y pilN para la formación de un complejo heterotrimérico que le proporciona estabilidad a la secretina PilQ (Ayers et al., 2009), se plantea realizar para futuros trabajos, experimentos que permitan su identificación. Además se sabe que PilQ interactúa con PilP y que PilA, la subunidad principal de pilina, interactúa con PilNOPQ, por lo que se propone para futuros trabajos realizar experimentos de interacción proteína-proteína que permitan determinar la presencia de PilP en *K. pneumoniae* (Tammam et al., 2013; McCallum et al., 2016)

En los ensayos moleculares confirmamos la existencia de homólogos de genes del pili tipo IV en dos genomas de *Klebsiella pneumoniae* analizados mediante PCR. Es importante resaltar que en Kp003, el aislado clínico de interés, los genes que fueron identificados por bioinformática se lograron amplificar y mostraron el tamaño de amplicón esperado. Si bien no se logró validar la existencia de *pilT*, *pilQ* y *pilM* en la cepa de referencia de *K. pneumoniae* ATCC 13883, consideramos que la falta de amplificación de los genes puede estar relacionada a alguna mutación puntual en su secuencia que estuviera alterando la eficiencia de la unión de los oligonucleótidos durante la PCR. Estas posibles mutaciones en ambos genes podrían justificar el por qué en la cepa ATCC13883 no se observó fenotipo de movilidad tipo twitching ni swarming. Dado que la secretina *pilQ* y *pilT* desempeñan un papel activo en el ensamblaje del pili tipo IV y es esencial en la movilidad tipo twitching (Wall et al., 1999). Debemos mejorar las condiciones de PCR, considerando también el diseño de los oligonucleótidos, para validar tales genes. Los hallazgos de los genes que se lograron amplificar en las cepas Kp003 y ATCC13883 confirman la presencia de elementos del pili tipo IV en el genoma de estas dos cepas de *K. pneumoniae*. Sin

embargo, la presencia de dichos elementos del pili tipo IV en sus genomas no es suficiente para determinar que esta bacteria tiene un pili tipo IV funcional.

Anteriormente, se había reportado en el trabajo de maestría de López C. (2019) que Kp003 presentaba los fenotipos de movilidad tipo *twitching* y *swarming*. Por lo que bajo ambos fenotipos se realizaron microscopias de transmisión electrónica (TEM) en Kp003 y en *K. pneumoniae* ATCC13883. Se observaron estructuras similares al pili tipo IV bajo condiciones de movilidad tipo *swarming* (concentración de agar al 0.3%) en Kp003 a 48 horas de incubación. Estas estructuras mostraron una morfología clásica del pili tipo IV, (~6 nm de ancho), largos (varios μm) y flexibles (Berry & Pelicic, 2014). Cabe mencionar que en la literatura no se ha reportado que el Pili tipo IV esté relacionado con el fenotipo de *swarming*. Por lo que resulta interesante investigar en futuros trabajos por qué bajo estas condiciones *K. pneumoniae* presenta un pilus tipo IV putativo. Se conoce que la movilidad tipo *swarming* está dirigida por flagelos (Kearns, 2010). No obstante, en las microscopias no se observó la presencia de algún flagelo en estas condiciones. Asimismo, para descartar que tal movilidad estuviera relacionada con el flagelo, al realizar la búsqueda de genes de virulencia en el genoma ensamblado y anotado de Kp003 no se identificó algún gen que esté relacionado con el flagelo. Se debe realizar más experimentos que ayuden a resolver la hipótesis de si el pili tipo IV putativo de Kp003 puede estar relacionado con el fenotipo de *swarming*. Por otro lado, en las microscopias realizadas bajo condiciones de movilidad tipo *twitching* para Kp003 y *K. pneumoniae* ATCC13883 no se lograron apreciar estructuras correspondientes al pili tipo IV. Lo anterior, debido a problemas técnicos en la preparación de las muestras, por lo que es conveniente repetir los ensayos de microscopia para poder observar el comportamiento de estas cepas bajo tales fenotipos.

Sobre la expresión de los genes que constituyen y/o construyen un pili tipo IV, durante el fenotipo de movilidad tipo *swarming* solo logramos detectar la presencia de *pilA*, y *pilO* en la cepa Kp003 a las 48 horas de incubación. Es posible que únicamente la expresión de *pilA* mediante RT-PCR punto final se haya logrado determinar en comparación con los demás elementos del pili tipo IV, debido a que

el pilus se compone principalmente de múltiples copias de pilinas mayores (*pilA*) y las proteínas adicionales, están presentes en menor abundancia (Jacobsen et al., 2019). Lo anterior también se ha observado en *C. perfringens*, donde en diferentes condiciones de crecimiento a diferentes concentraciones de agar *pilA* mostró el nivel más alto de expresión seguido de *pilB* y luego del gen *pilC* (Soncini et al., 2020). La falta de amplificado para los demás elementos del pili tipo IV, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilQ*, *pilT*, *pilM*, *pilN* y *pilX* puede tener dos causas, la primera relacionada con errores técnicos durante el proceso de extracción de ARN, en la síntesis de cDNA, o en la PCR. Debido a que en el presente trabajo se realizó RT-PCR punto final, es conveniente repetir los experimentos realizando qPCR, la cual permitirá detectar con mayor sensibilidad y en función del tiempo la presencia de amplificado de los todos los genes que codifican el pili. La segunda causa puede estar relacionada a que los genes faltantes no se expresan activamente en el tiempo y/o bajo las condiciones usadas en el presente estudio. En otros trabajos en los que se utilizó como modelo de estudio a *P. salmonis*, la expresión de *pilA*, *pilB*, *pilD* y *pilQ* aumentó en los primeros periodos de incubación en medio líquido, alcanzando la expresión máxima a las 8 horas de incubación y sufriendo una disminución de los niveles de expresión en tiempos posteriores (Sánchez et al., 2018). Por lo anterior, resulta conveniente repetir la obtención de cDNA bajo condiciones de movilidad swarming y twitching a tiempos de incubación menores de 48 hrs y determinar si los demás genes involucrados en la biogénesis del pilus se expresan antes o después de la mayor expresión de *pilA*.

10. Conclusiones

- Los elementos principales involucrados en la biogénesis del pili tipo IV están presentes en secuencias públicas de *K. pneumoniae* y en la cepa clínica Kp003. El pilus de *K. pneumoniae* es un pili tipo IVa.
- La cepa Kp003 posee en su genoma los elementos genéticos principales para la biogénesis del pili tipo IV.
- El aislado clínico Kp003 pertenece a la especie de *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*.
- Las condiciones que favorecen a la expresión de *pilA* y *pilO* en Kp003 bajo condiciones de movilidad tipo *swarming* fueron a las 48 horas en una concentración de agar del 0.3%. La microscopía electrónica de transmisión corroboró la existencia de una estructura similar al pili tipo IV bajo estas mismas condiciones.

11. Perspectivas

- Analizar el transcriptoma de Kp003 bajo condiciones de movilidad tipo *swarming* y *twitching* a las 48 horas de incubación y a tiempos menores para evaluar la transcripción de los genes involucrados en la síntesis del pili tipo IV.
- Corroborar con otras técnicas de microscopía (inmunomarcación o microscopía electrónica de barrido) la existencia del pili tipo IV de Kp003, bajo condiciones de movilidad *swarming* y *twitching*
- Obtener la mutante de al menos dos genes imprescindibles para la biogénesis de pilus, como *pilA* y *pilD* en la cepa clínica Kp003 para realizar ensayos de movilidad y ensayos de infección en líneas celulares para conocer la función del pili tipo IV en la patogenicidad de Kp003.
- Rediseñar los oligonucleótidos para la amplificación de los genes *pilQ* y *pilT* con la finalidad de repetir los ensayos de PCR y RT-PCR en la cepa de referencia de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC13883 para corroborar o descartar la presencia de los elementos del pili tipo IV.

12. Referencias

- Allen BL, Gerlach GF, Clegg S. (1991). Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol 173:916–920.
- Amraie H, Shakib P, Rouhi S, Bakhshandeh N, Zamanzad B. Prevalence assessment of magA gene and antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimens in Shahrekord, Iran. Iran J Microbiol. 2014; 6, 311-6. [PubMed] [Google Scholar]
- Anes, J., Hurley, D. L., Martins, M., & Fanning, S. (2017). Exploring the Genome and Phenotype of Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. Frontiers in Microbiology, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01913>
- Arias-Flores R, Rosado-Quiab U, Vargas-Valerio A, Grajales-Muñiz C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 54(1):20-4
- Asri, N. A. M., Ahmad, S., Mohamud, R., Hanafi, N., Zaidi, N. S., Irekeola, A. A., Shueb, R. H., Yee, L. C., Noor, N. M., Mustafa, F. H., Yean, C. Y., & Yusof, N. Y. (2021). Global Prevalence of Nosocomial Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. Antibiotics, 10(12), 1508. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121508>
- Bakaletz, L. O., Baker, B., Jurcisek, J. A., Harrison, A., Novotny, L. A., Bookwalter, J. E., Mungur, R., & Munson, R. S. (2005). Demonstration of Type IV Pilus Expression and a Twitching Phenotype by *Haemophilus influenzae*. Infection and Immunity, 73(3), 1635-1643. <https://doi.org/10.1128/iai.73.3.1635-1643.2005>
- Bengoechea, J. A., & Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. Fems Microbiology Reviews, 43(2), 123-144. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>
- Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. (2016) Host receptors for bacteriophage adsorption. FEMS Microbiol Lett. Feb;363(4):fnw002. doi: 10.1093/femsle/fnw002. Epub 2016 Jan 10. PMID: 26755501.
- Burdman, S., Bahar, O., Parker, J. D., & De La Fuente, L. (2011). Involvement of Type IV Pili in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria. Genes, 2(4), 706-735. <https://doi.org/10.3390/genes2040706>
- Carabarin-Lima, A., León-Izurieta, L., Rocha-Gracia, R. D. C., Castañeda-Lucio, M., Torres, C., Gutiérrez-Cazarez, Z., González-Posos, S., Martínez de la Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., & Lozano-Zarain, P. (2016). First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. Journal of Medical Microbiology, 65(8), 729–737. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000291>
- Chang Y.-W., Rettberg Lee A., Treuner-Lange A., Iwasa J., Lotte-Søgaard A., y Jensen G.J. (2016). Architecture of the type IVa pilus machine. 351: 1–18.

- Cheng, D. L., Liu, Y. C., Yen, M. Y., Liu, C. Y., & Wang, R. S. (1991). Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Archives of internal medicine*, 151(8), 1557–1559.
- Cheng, N.C., Tai, H.C., Chang, S.C., Chang, C. H., & Lai, H. S. (2015). Fascitis necrosante en pacientes con diabetes mellitus: características clínicas y factores de riesgo de mortalidad. *BMC enfermedades infecciosas*, 15,417. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1144-0>
- Clausen, M., Jakovljevic, V., Sogaard-Andersen, L., & Maier, B. (2009). High-Force Generation Is a Conserved Property of Type IV Pilus Systems. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4633-4638. <https://doi.org/10.1128/jb.00396-09>
- Clegg S., y Murphy C.N. 2016. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*. 4.
- Craig L., y Li J. 2008. Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current Opinion in Structural Biology*. 18: 267–277.
- Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2004 May;2(5):363-78. doi: 10.1038/nrmicro885. PMID: 15100690
- Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. (2014). Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS microbiology reviews*, 38(4), 660–697. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12056>
- Effah C.Y., Sun T., Liu S., y Wu Y. 2020. *Klebsiella pneumoniae*: An increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 19: 1–9.
- Ellison, C. K., Dalia, A. B., Ceballos, A. V., Wang, J., Biais, N., & Brun, Y. V. (2018). Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*. *Nature microbiology*, 3(7), 773-780. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0174-y>
- Clausen, M., Koomey, M. & Maier, B. Dynamics of type IV pili is controlled by switching between multiple states. *Biophys. J*. 96, 1169–1177 (2009).
- Finn, R. D., Clements, J., Arndt, W., Miller, B. L., Wheeler, T. J., Schreiber, F., Bateman, A., & Eddy, S. R. (2015). HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W30-W38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv397>
- Forero M, Yakovenko O, Sokurenko EV, Thomas WE, Vogel V (2006) Uncoiling Mechanics of *Escherichia coli* Type I Fimbriae Are Optimized for Catch Bonds. *PLoS Biol* 4(9): e298. doi:10.1371/journal.pbio.0040298
- Goosens, V. J., Busch, A., Georgiadou, M., Castagnini, M., Forest, K. T., Waksman, G., & Pelicic, V. (2017). Reconstitution of a minimal machinery capable of assembling periplasmic type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(25), E4978–E4986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618539114>

- Gu D, Huang Y, Ma J, Zhou H, Fang Y, Cai J, Hu Y, Zhang R. Detection of Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates from an Infant with Diarrhea in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 5099-100. [PubMed] [Google Scholar]
- Hansen DS, Mestre F, Alberti S, Hernandez-Alles S, Alvarez D, Domenech-Sanchez A, Gil J, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ. 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**:56–62.
- Haynes C , Blach C . 2006 . Manejo de información . En: JL Haines , MA Pericak - Vance , editores. Análisis genético de enfermedades complejas . Hoboken, Nueva Jersey: Wiley. págs. 219 – 235.
- Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *The New England journal of medicine*, 370(13), 1198–1208. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306801>
- Huynh DTN, Kim AY, Kim YR. Identification of Pathogenic Factors in *Klebsiella pneumoniae* Using Impedimetric Sensor Equipped with Biomimetic Surfaces. *Sensors (Basel)*. 2017 Jun 15;17(6):1406. doi: 10.3390/s17061406. PMID: 28617330; PMCID: PMC5492845.
- Jacobsen, T., Bardiaux, B., Francetic, O., Izadi-Pruneyre, N., & Nilges, M. (2020). Structure and function of minor pilins of type IV pili. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(3), 301-308. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00642-5>
- Jakovljevic, V., Leonardy, S., Hoppert, M., & Søgaard-Andersen, L. (2008). PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *Journal of bacteriology*, 190(7), 2411–2421. <https://doi.org/10.1128/JB.01793-07>
- Jiang, H., & Ganesan, N. (2016). CUDAMPF: a multi-tiered parallel framework for accelerating protein sequence search in HMMER on CUDA-enabled GPU. *BMC bioinformatics*, 17, 106. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0946-4>
- Jones, C. W., Utada, A. S., Davis, K. A., Thongsomboon, W., Sanchez, D., Banakar, V., Cegelski, L., Wong, G. C. L., & Yildiz, F. H. (2015b). C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in *Vibrio cholerae*. *PLOS Pathogens*, 11(10), e1005068. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005068>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Köhler, W. y Mochmann, H. (1987). Carl Friedländer (1847–1887) y el descubrimiento del neumococo, en memoria del centenario de su muerte. *Z. Arztl. Fortbild.* 81, 615–618.

- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., & Pechère, J. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5990-5996. <https://doi.org/10.1128/jb.182.21.5990-5996.2000>
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 18(3), 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
- Kolappan, S., Coureuil, M., Xiong, Y., Nassif, X., Egelman, E. H., & Craig, L. (2016). Structure of the neisseria meningitidis type IV pilus. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms13015>
- LaPointe CF, Taylor RK. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):1502-10. doi: 10.1074/jbc.275.2.1502. PMID: 10625704.
- Leong, C. G., Bloomfield, R. A., Boyd, C. A., Dornbusch, A. J., Lieber, L., Liu, F., Owen, A., Slay, E., Lang, K. M., & Lostroh, C. P. (2017). The role of core and accessory type IV pilus genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi*. *PLOS ONE*, 12(8), e0182139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182139>
- 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., & Emerging Infections Program
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- McCallum, M., Tammam, S., Khan, A., Burrows, L. L., & Howell, P. L. (2017). The molecular mechanism of the type IVa pilus motors. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms15091>
- Melville S., y Craig L. 2013. Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77: 323–341.
- Moore, J. H. (2007). Bioinformatics. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 365–369. <https://doi.org/10.1002/jcp.21218>
- Murray, T. F., & Kazmierczak, B. I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Sliding Motility in the Absence of Type IV Pili and Flagella. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2700-2708. <https://doi.org/10.1128/jb.01620-07>
- Navarro-Navarro M., Robles-Zepeda R.E., Garibay-Escobar A., y Ruiz-Bustos E. 2011. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de β -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Salud Publica de Mexico*. 53: 341–344.
- Paczosa M.K., y Mecsas J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a

- Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80: 629–661.
- Patel, P. K., Russo, T. A., & Karchmer, A. W. (2014). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Open Forum Infectious Diseases*, 1(1). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu028>.
- Han, X., Kennan, R. M., Parker, D., Davies, J. K., & Rood, J. I. (2007). Type IV fimbrial biogenesis is required for protease secretion and natural transformation in *Dichelobacter nodosus*. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5022-5033. <https://doi.org/10.1128/jb.00138-07>
- Imam, S., Chen, Z., Roos, D. S., & Pohlschroder, M. (2011). Identification of surprisingly diverse type IV pili, across a broad range of Gram-Positive bacteria. *PLOS ONE*, 6(12), e28919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028919>
- Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. (2001) Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol*. Jul;67(7):3325-7. doi: 10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001. PMID: 11425763; PMCID: PMC93022.
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11(4), 589–603.
- Pohlschroder, M., & Esquivel, R. N. (2015). Archaeal type IV pili and their involvement in biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 6, 190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00190>
- Raetz, C. & Whitfield, C. "Lipopolysaccharide endotoxins". *Annu. Rev. Biochem.* 71. (2002): 635-700.
- Ray, CG y Ryan, KJ (2004). *Microbiología médica de Sherris: una introducción a las enfermedades infecciosas*. Nueva York: McGraw-Hill.
- Russo, T. A., Olson, R., MacDonald, U., Metzger, D., Maltese, L. M., Drake, E. J., & Gulick, A. M. (2014). Aerobactin Mediates Virulence and Accounts for Increased Siderophore Production under Iron-Limiting Conditions by Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 82(6), 2356–2367. <https://doi.org/10.1128/iai.01667-13>
- Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A. P., & Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 19(10), 2221-2228. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.10.2221>
- Scheld W.M. (1991). Evolución de la patogénesis, diagnóstico y tratamiento de la neumonía nosocomial. *Cirugía, ginecología y obstetricia*, 172 Suppl, 42–53.
- 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 microbiology*, 10, 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>

- Stahlhut SG, Tchesnokova V, Struve C, Weissman SJ, Chattopadhyay S, Yakovenko O, Aprikan P, Sokurenko EV, Krogfelt KA. 2009. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191:6592–6601. doi:10.1128/JB.00786-09.
- Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun* 76:4055–4065. doi:10.1128/IAI.00494-08.
- Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity*, 77(11), 5016–5024. <https://doi.org/10.1128/IAI.00585-09>
- Szeto, T. H., Dessen, A., & Pelicic, V. (2011). Structure/function analysis of *Neisseria meningitidis* PilW, a conserved protein that plays multiple roles in type IV pilus biology. *Infection and immunity*, 79(8), 3028–3035. <https://doi.org/10.1128/IAI.05313-11>
- Takhar, H. K., Kemp, K. C., Kim, M., Howell, P. L., & Burrows, L. L. (2013). The Platform Protein Is Essential for Type IV Pilus Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9721-9728. <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.453506>
- Treuner-Lange, A., Chang, Y., Glatter, T., Herfurth, M., Lindow, S., Chreifi, G., Jensen, G. J., & Søgaard-Andersen, L. (2020). PiLY1 and minor pilins form a complex priming the type IVA pilus in *Myxococcus xanthus*. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18803-z>
- Tammam, S., Sampaleanu, L., Koo, J., Manoharan, K., Daubaras, M., Burrows, L. L., & Howell, P. (2013). PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus System Form a Transenvelope Protein Interaction Network That Interacts with PilA. *Journal of Bacteriology*, 195(10), 2126–2135. <https://doi.org/10.1128/jb.00032-13>
- Tammam, S., Sampaleanu, L., Koo, J., Sundaram, P. V., Ayers, M., Chong, P. A., Forman-Kay, J. D., Burrows, L. L., & Howell, P. (2011). Characterization of the PilN, PilO and PilP type IVa pilus subcomplex. *Molecular Microbiology*, 82(6), 1496–1514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07903.x>
- Tarkkanen AM, Westerlund-Wikstrom B, Erkkila L, Korhonen TK. 1998. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 66:2356–2361
- Tártara S.G. 2013. Patógenos Emergentes-Tercera Parte "*Klebsiella Pneumoniae* Productora De Carbapenemasas (Kpn-Kpc) " Emerging Pathogens-Part Iii. *Trasplante*. 33: 103–109.
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R., & Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-

2014. *Infection control and hospital epidemiology*, 37(11), 1288–1301. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.174>

Wheeler, T. J., & Eddy, S. R. (2013). nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. *Bioinformatics*, 29(19), 2487–2489. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt403>

Winther-Larsen, H. C., Hegge, F. T., Wolfgang, M. C., Hayes, S. F., Van Putten, J. P. M., & Koomey, M. (2001). Neisseria gonorrhoeae PILV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15276-15281. <https://doi.org/10.1073/pnas.261574998>

Wolfgang, M. C., Park, H. S., Hayes, S. F., Van Putten, J. P. M., & Koomey, M. (1998). Suppression of an absolute defect in Type IV pilus biogenesis by loss-of-function mutations in pilT, a twitching motility gene in Neisseria gonorrhoeae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14973–14978. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14973>

Wyres K.L., Lam M.M.C., y Holt K.E. 2020. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*. 18: 344–359.

Yoon, B. (2009). Hidden Markov Models and their Applications in Biological Sequence Analysis. *Current Genomics*, 10(6), 402-415. <https://doi.org/10.2174/138920209789177575>

Zarb, P., Coignard, B., Griskeviciene, J., Muller, A., Vankerckhoven, V., Weist, K., Goossens, M., Vaerenberg, S., Hopkins, S., Catry, B., Monnet, D., Goossens, H., Suetens, C., National Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey, & Hospital Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey (2012). The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 17(46), 20316. <https://doi.org/10.2807/ese.17.46.20316-en>

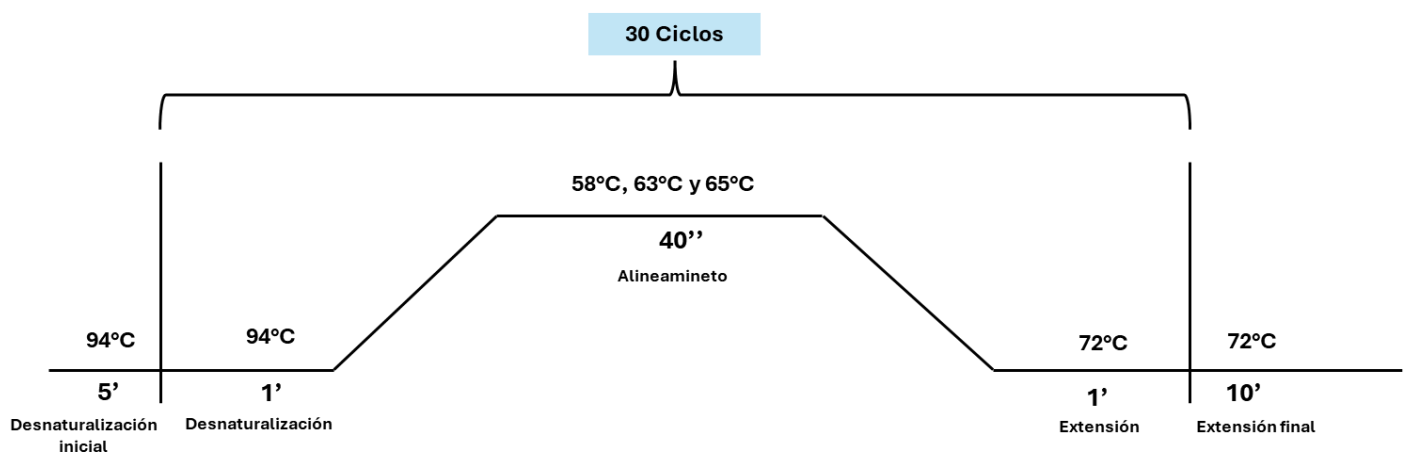
Zolfaghar, I., Evans, D. M., & Fleiszig, S. M. J. (2003). Twitching Motility Contributes to the Role of Pili in Corneal Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 71(9), 5389-5393. <https://doi.org/10.1128/iai.71.9.5389-5393.2003>

Anexos

Anexo1. Parámetros de alineamientos múltiples en Clustal W

Parámetro	Valor	
	ADN	Proteínas
Gap abierto	15.0	10.0
Gap extensión	0.05	6.66
Weight Transition	0.5	0.5

Anexo 2. Condiciones de PCR para la amplificación de genes involucrados en el pili tipo IV de *K.pneumoniae*



Anexo 3. Soluciones empleadas en la extracción de RNA.

Solución A

36.9 ml Agua DPEC

2.0 ml de SDS 10% (final 0.5%)

0.267 ml de Acetato de Sodio 3 M pH 4.8 (final 20 mM)

0.8 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 (final 10 mM)

40.00 ml de volumen final

Fenol Ácido

100.0 ml de Fenol disuelto

100.0 ml de Acetato de Sodio 0.02 M pH 4.0

Anexo 4. Resultados del análisis de control de calidad de secuencias con FastQc.

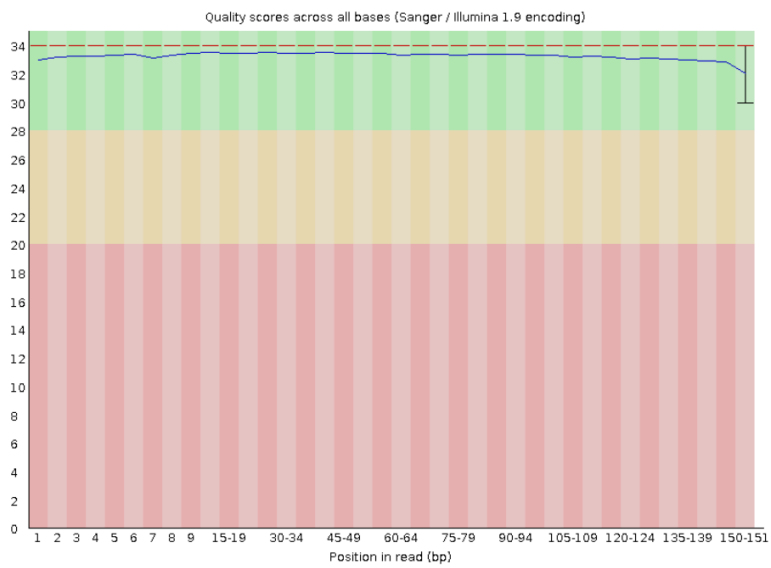
Estadísticas Básicas

Medida	Valor
Nombre del archivo	Kp003_173500_2_1.rev.fastq
Tipo de archivo	Llamadas de base convencionales
Codificación	Sanger/Illumina 1.9
Secuencias totales	3575573
Bases totales	527,1 Mbps
Secuencias marcadas como de mala calidad	0
Longitud de la secuencia	35-151
%GC	57

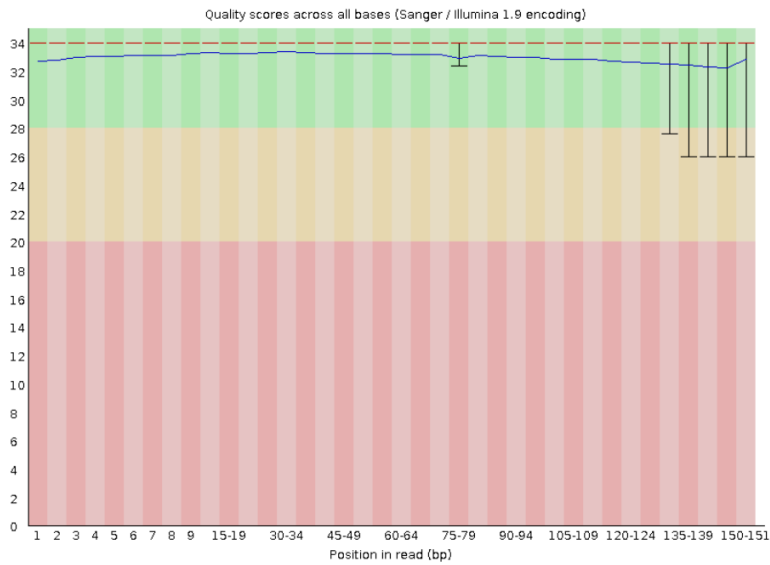
✓ Estadísticas Básicas

Medida	Valor
Nombre del archivo	Kp003_2_paired_173500_5_1.rev.fastq
Tipo de archivo	Llamadas de base convencionales
Codificación	Sanger/Illumina 1.9
Secuencias totales	3535262
Bases totales	517,7 Mbps
Secuencias marcadas como de mala calidad	0
Longitud de la secuencia	36-151
%GC	57

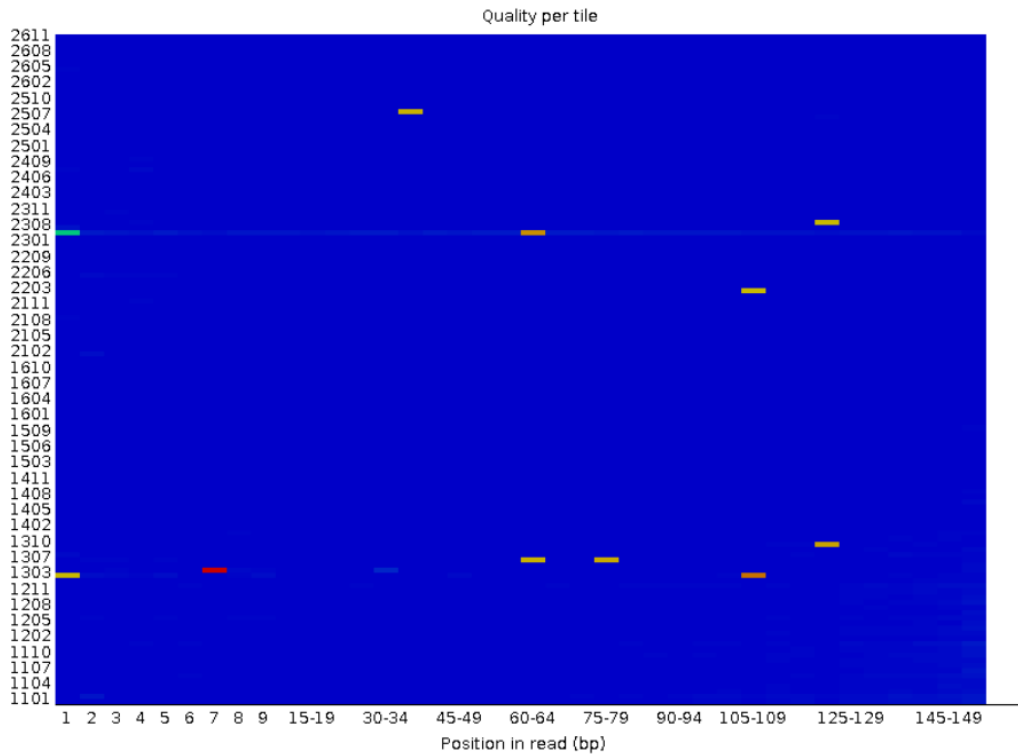
✓ Calidad por secuencia de bases

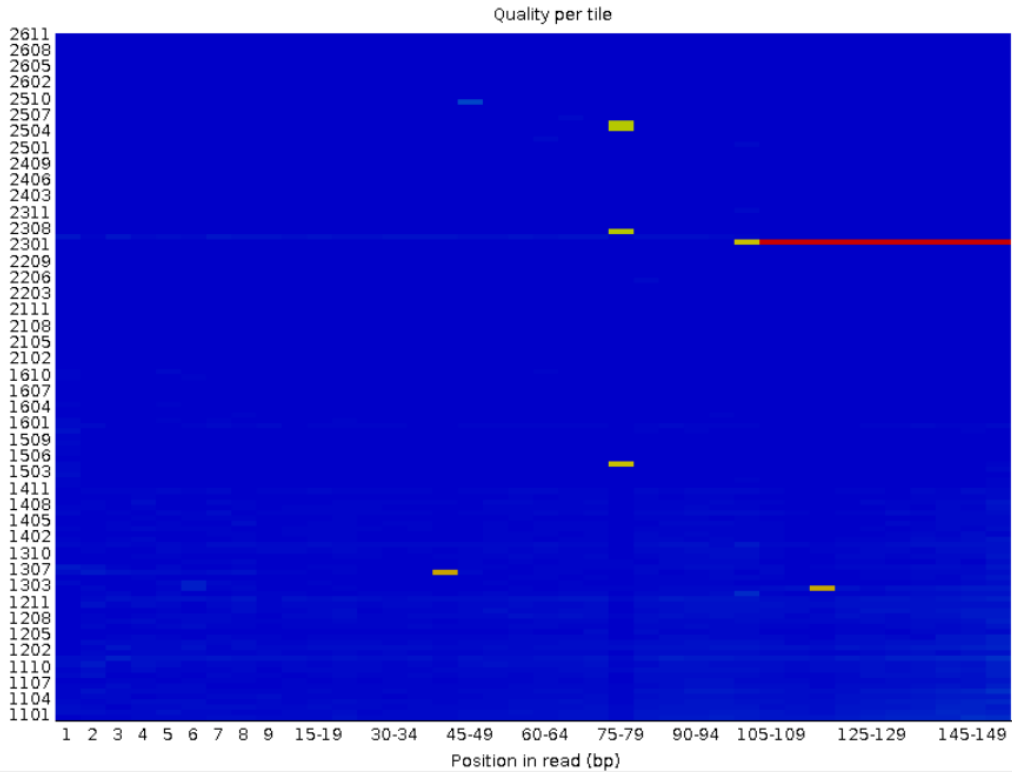


✔ Calidad por secuencia de bases

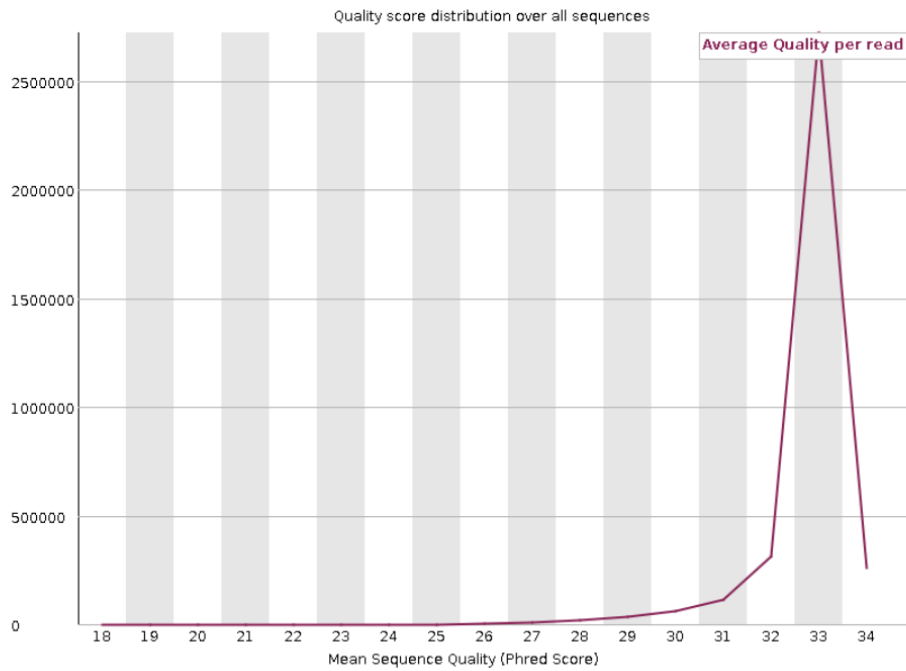


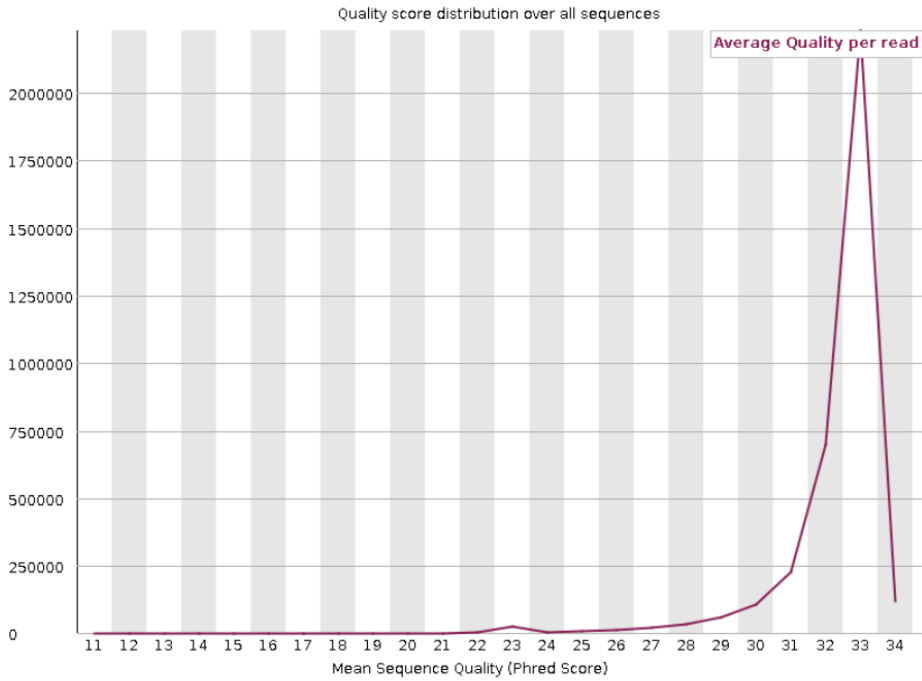
El eje y del gráfico muestra los puntajes de calidad. El fondo del gráfico divide el eje y en base calling de buena calidad (verde), base calling de calidad razonable (naranja) y base calling de mala calidad (rojo).



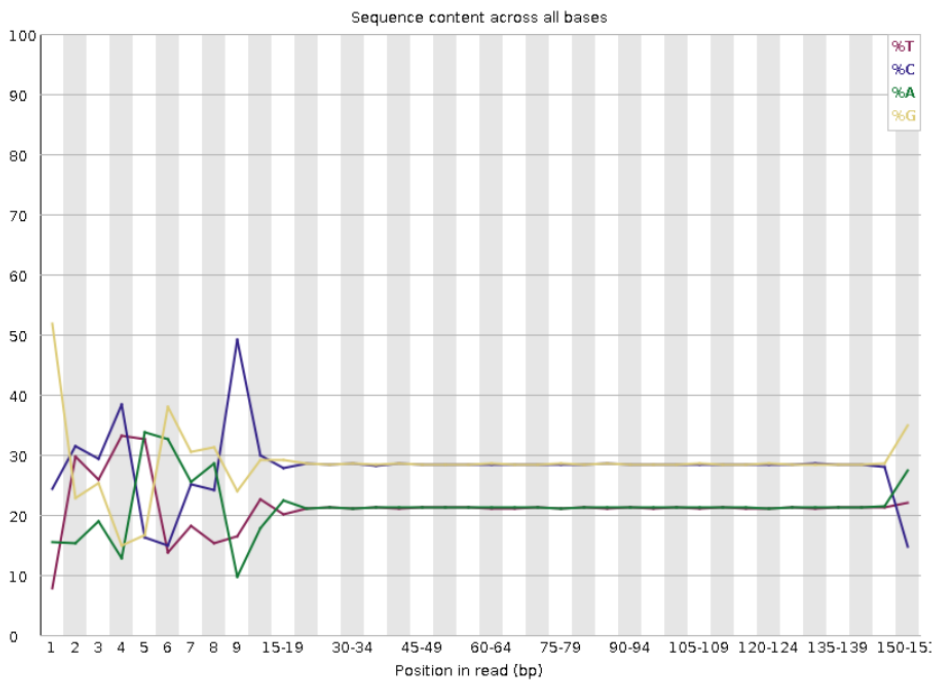


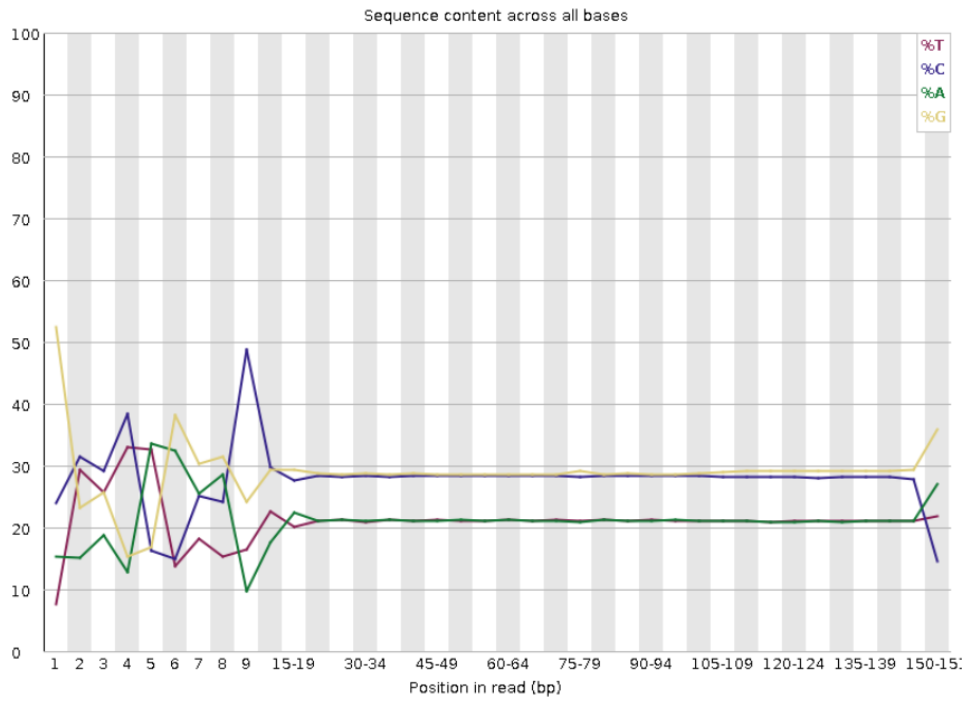
✔ **Puntuaciones de calidad por secuencia**



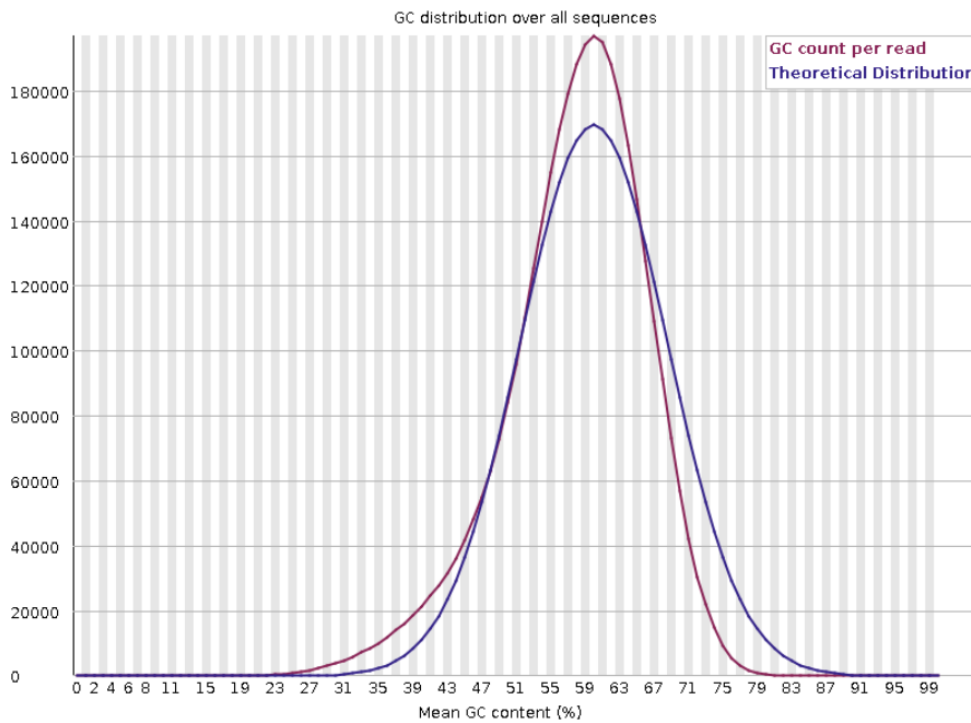


✖ Por contenido de secuencia de bases

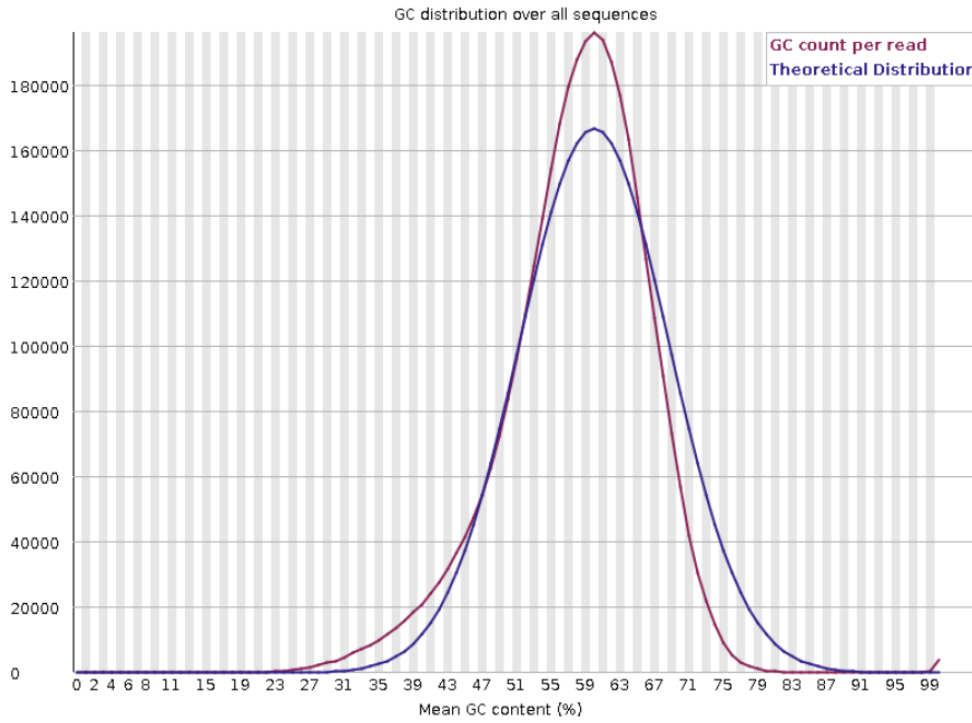




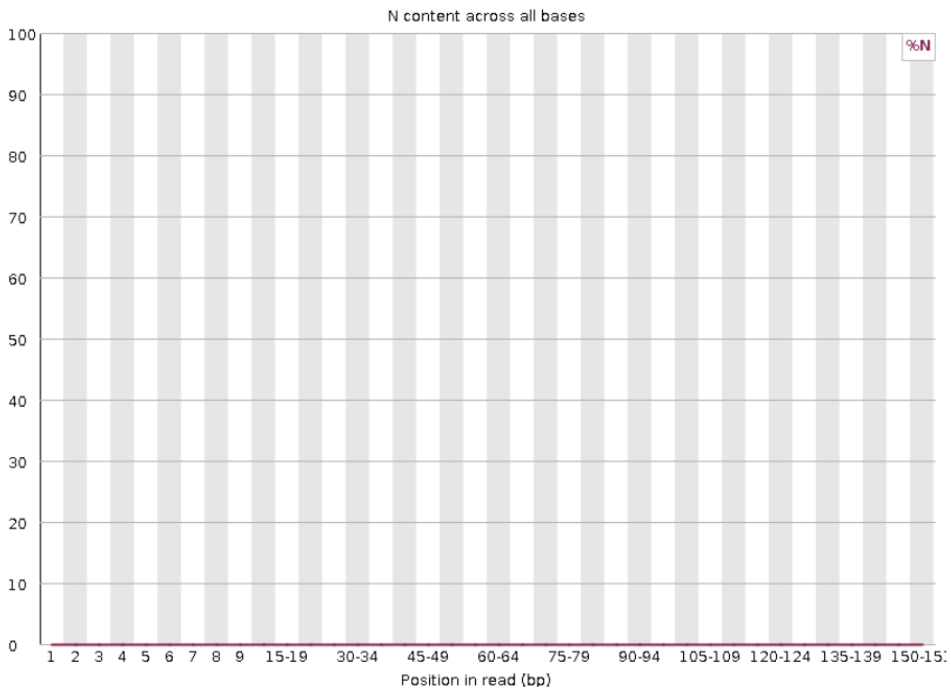
Contenido de GC por secuencia



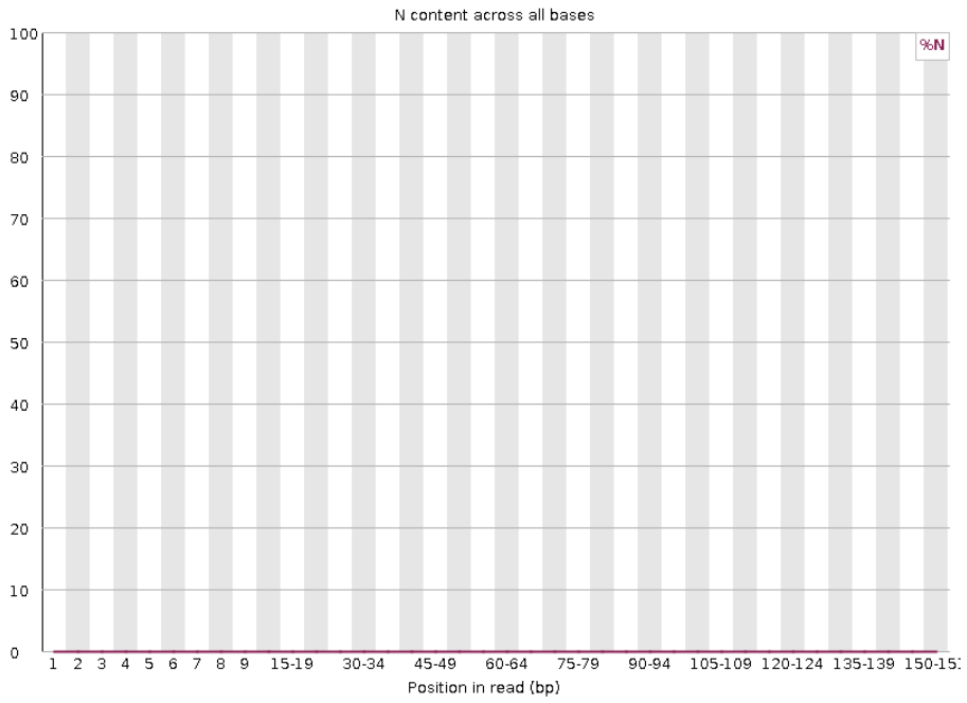
⚠ Contenido de GC por secuencia



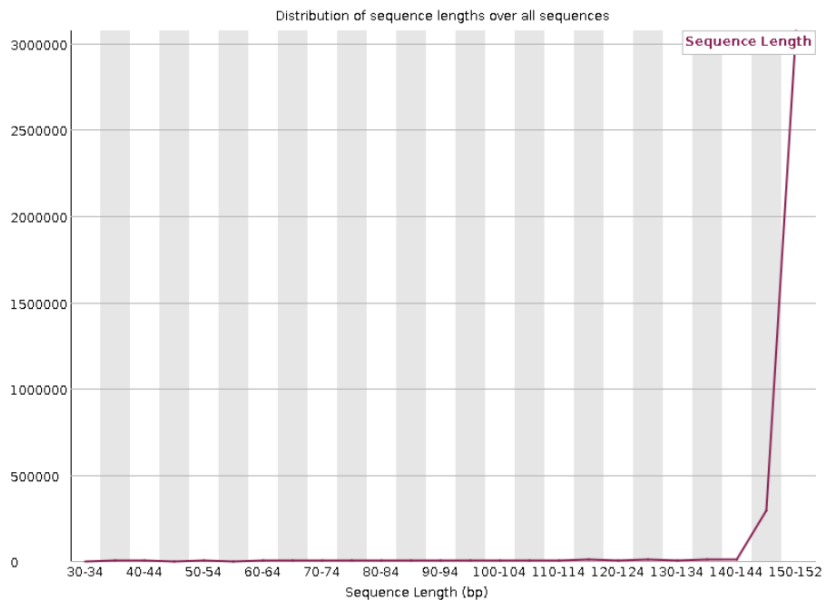
✅ Por contenido de N base



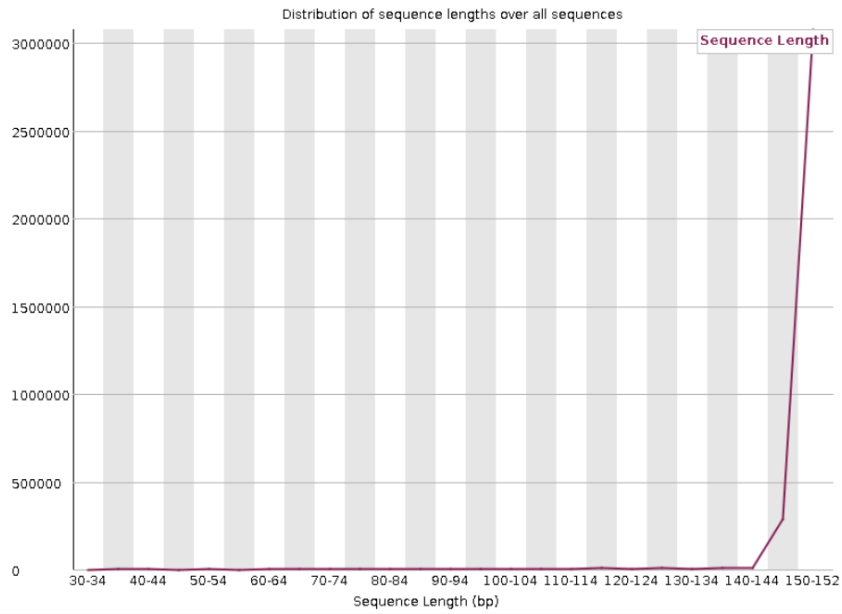
✔ **Por contenido de N base**



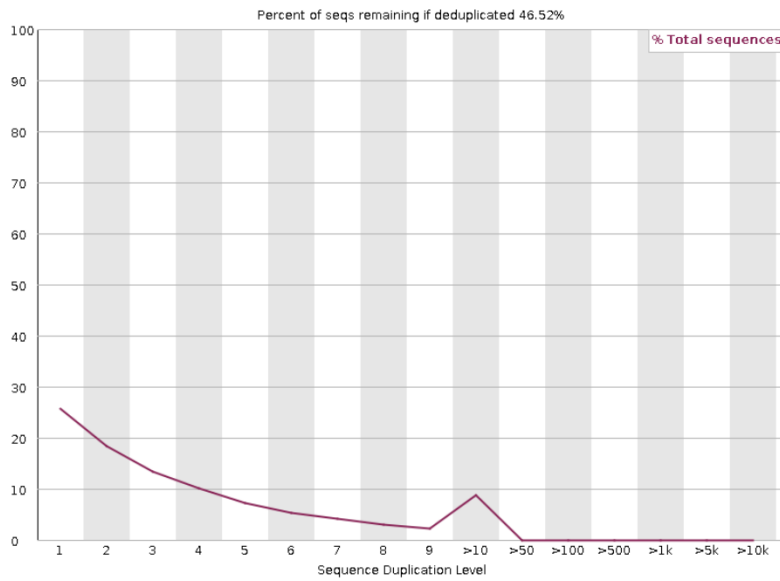
⚠ **Distribución de longitud de secuencia**



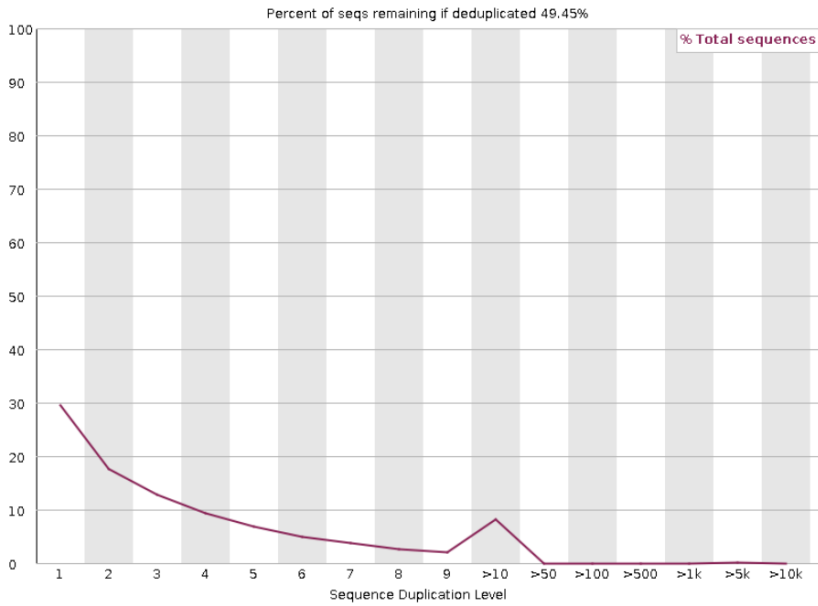
! Distribución de longitud de secuencia



✖ Niveles de duplicación de secuencia



❌ Niveles de duplicación de secuencia



✅ Contenido del adaptador

