



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Caracterización de genes de adhesión y de
protectinas en cepas clínicas de *Klebsiella
pneumoniae*.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA

ERIKA FERNANDA PÉREZ FLORES

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA, UNAM, PAPIIT IN22502



Los Reyes Iztacala, Edo. Méx. Octubre 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<< La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se
asocian.>>

-Lynn Margulis

<< Nada en biología tiene sentido sino es a la luz de la evolución.>>

-Teodosio Dobzhansky

DEDICATORIA

A mi mamá Alma Patricia por ser siempre para mí un ejemplo de perseverancia, inteligencia y liderazgo, por estar ahí muy a su manera demostrándome su apoyo y amor.

A mi papá por preocuparse por mí en todos los sentidos, que a cualquier hora o circunstancia siempre está para mí, por enseñarme tanto sobre la vida, aprender a reír y disfrutarla

A mi hermano Luis David por ser mi confidente al escucharme sin importar cuantas veces hable de lo mismo, que, aunque somos muy diferentes encajamos perfectamente.

A mis abuelos Petronilo y Silvia por apoyarme incondicionalmente desde que estaba chiquita y haber contribuido a mi crianza y formación.

A mi familia porque cada uno de ellos a puesto su granito a la mujer que soy hoy.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por ser el recinto de mi formación profesional y mi segunda casa durante los cuatro años de carrera.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN22502.

A la Dra. Gloria Luz Paniagua por darme la confianza y permitirme desarrollar este proyecto en el laboratorio además de enriquecer mi formación con sus enseñanzas.

Al Dr. Eric Monroy por estar al pendiente de la correcta realización de mi proyecto y contribuir a mejorar mi desempeño en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer más amenas las tardes que pasábamos en nuestro lugar de trabajo y ser la mejor compañía.

A mis amigos Mireles, Sofi, Marisa y Leo por acompañarme en este camino, ser en repetidas ocasiones no sólo mis compañeros de equipo sino compañeros de aventuras, por no sólo congeniar académicamente sino compartir buenos momentos fuera de las aulas, gracias a ustedes todo fue más sencillo.

A Paulina, Naye, Kevin y Emmanuel por dar el primer paso a la vida universitaria juntos y demostrarme que la carrera te puede hacer conocer personas increíbles, amistades que siempre quieres conservar.

A Porfirio por ser el mejor amigo que la vida me ha podido dar, porque a pesar de no vernos tan seguido siempre me motiva a seguir haciendo lo que me gusta y sé que no importa cuanto tiempo pase, incondicionalmente tengo su apoyo y cariño.

A Eshley por compartir conmigo esta etapa de mi vida siempre creyendo en mí, alentándome a ser mejor persona cada día y estar conmigo en mis peores momentos, gracias por ver en mí lo que a veces ni yo misma percibo. Te amo y espero que esta etapa sea sólo el comienzo.

Sobre todo, gracias a la Biología, por ser la ciencia más maravillosa que me permitió desarrollar mi curiosidad e investigar, por ser el primer escalón en mi vida profesional, porque es gracias a ella que encontré algo que realmente me apasiona.

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
Características de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
Patología por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
Resistencia antimicrobiana.....	10
Mecanismos de resistencia.....	12
Factores de virulencia	14
Cápsula.....	16
Lipopolisacárido (LPS).....	17
Fimbrias.....	18
Biopelículas.....	19
Sideróforos.....	20
Toxinas	21
JUSTIFICACIÓN.....	21
ANTECEDENTES	22
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Obtención y resiembra de las muestras	25
Extracción del DNA.....	25
Identificación de <i>K. pneumoniae</i>	25
Análisis por electroforesis en gel de agarosa	26
Detección de genes de virulencia por PCR	26
Extracción de RNAm a partir del cultivo bacteriano.....	28
Reversotranscripción	30

Expresión de marcadores de virulencia	30
Análisis estadístico.....	31
ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
Origen de las cepas	32
Identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
Frecuencia de los genes de virulencia de <i>K. pneumoniae</i> asociados a los diagnósticos clínicos de los pacientes.....	34
Patrones de asociación	38
Detección de la expresión de los genes de virulencia de <i>K. pneumoniae</i> ..	38
Análisis estadístico.....	44
DISCUSIÓN	45
Pacientes analizados	45
Identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en cepas de distinto origen.....	45
Presencia de genes de virulencia.....	47
Expresión de genes de virulencia	49
CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA	52

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es considerada un patógeno nosocomial oportunista, lo cual la convierte en una especie bacteriana de importancia clínica. Esta bacteria tiene la capacidad de colonizar superficies mucosas y diseminarse a diferentes tejidos provocando enfermedades en el tracto urinario, neumonía e incluso bacteremia.

Existen cepas de *K. pneumoniae* consideradas como hipervirulentas, en las cuales se ha demostrado que la expresión de distintos factores de virulencia influye en su patogenicidad. Algunos de estos factores son la cápsula, la hipermucoviscosidad, las adhesinas, protectinas, entre otros. Por ello, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los genes de adhesión y de protectinas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias, urinarias y bacteremia.

Se aislaron las cepas de un grupo de pacientes del Hospital General Regional (HGR) no. 72 y de la clínica 64 de Tequexquínahuac, Tlalnepantla de Baz, Edo. Méx. Se identificó *K. pneumoniae* mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) amplificando del gen 16-23S rRNA. Los genes relacionados con adhesinas (*fimH*, *kpn* y *mrkD*) y protectinas (*ycfM*, *rmpA* y *magA*) fueron identificados por PCR convencional. Las cepas fueron sembradas en caldo BHI (infusión cerebro-corazón) y ST (Soya Trypticaseína), para determinar su expresión utilizando la técnica de la PCR en Tiempo Real.

Los genes *fimH-1*, *kpn* y *mrkD* con función de síntesis de adhesinas, se encontraron en el 100% de las cepas (n= 5), al igual que el gen *ycfM* relacionado con la formación de cápsula, mientras que *rmpA* y *magA* asociados con la hipermucoviscosidad, fueron encontrados en el 80% (n=4) y 60% (n=3) respectivamente.

Asimismo, los genes *kpn* (Figura 11) y *mrkD*, así como el gen *ycfM* se expresaron en el 100% (n=5) de las cepas en ambos medios de cultivo. De igual forma, *fimH-1* se expresó en el 100% (n=5) de cepas en medio BHI, mientras que las cepas en medio ST expresaron este mismo gen en un 60% (n=3).

Por otro lado, *rmpA* y *magA* relacionados con la hipermucoviscosidad, no se expresaron en ninguna de las cepas de *K. pneumoniae* en los distintos medios.

Los genes de virulencia *fimH-1*, *kpn*, *mrkD* y *ycfM* fueron encontrados en todas las cepas siendo indistinto el diagnóstico de los pacientes y aquellos genes asociados a la hipermucoviscosidad no se expresaron en ninguna de las cepas de los pacientes con diferentes infecciones.

La elevada expresión de los genes de virulencia demostró la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones graves en los pacientes hospitalizados.

Palabra clave: *Klebsiella pneumoniae*, factores de virulencia, hipervirulencia, adhesinas, protectinas.

INTRODUCCIÓN

Características de *Klebsiella pneumoniae*

El género *Klebsiella* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, está conformado por bacterias Gramnegativas, son bacilos no móviles, anaerobios facultativos, oxidasa negativa, catalasa positiva. Algunas cepas son productoras de gas como resultado de la fermentación de carbohidratos, como lactosa y sacarosa (Brooks, *et al.*, 2017).

Son organismos capaces de producir una cápsula compuesta mayormente de polisacáridos, la cual les confiere un aspecto mucoide y es considerada un factor importante de patogenicidad (El Fertas-Aissani *et al.*, 2012; Cubero, 2015). La mayoría de las cepas de *Klebsiella* son fijadoras de nitrógeno, lo cual es una característica poco común de bacterias entéricas (Madigan *et al.*, 2015).

Las especies que comprenden el género *Klebsiella* son encontradas en diversos hábitats en la naturaleza como en el agua, suelo y plantas. En el caso de las plantas, es capaz de asociarse con ella colonizando sus tejidos internos, sin embargo, es beneficioso para la planta pues gracias a que es una bacteria fijadora de nitrógeno, provee suficiente nitrógeno a la planta. Por otro lado, también crecen en superficies mucosas de los mamíferos principalmente, colonizando el tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal provocando infecciones graves en el hospedero (Garza-Ramos, *et al.*, 2015). Las cepas de *Klebsiella* encontradas en el ambiente han presentado mayor susceptibilidad a antibióticos que las cepas clínicas, sugiriendo que existe una presión de selección en el ambiente clínico (Martin y Bachman, 2018).

Se conocen varias especies patógenas de este género, las principales son dos *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* que, a pesar de estar íntimamente relacionadas, esta última es la especie de mayor importancia médica.

Patología por *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es considerada un patógeno nosocomial oportunista es capaz de colonizar superficies mucosas sin causar ninguna patología (Catalán-Nájera *et al.*, 2019; Bengoechea y Sa Pessoa, 2019). El riesgo de contraer una infección por esta bacteria aumenta en pacientes hospitalizados, ya que son aquellos que pueden tener mayor contacto con instrumental médico contaminado, como equipo de respiración artificial y de anestesia, además de otras rutas de transmisión como soluciones antisépticas, catéteres, equipo especializado y el personal médico (Vuotto, *et al.*, 2017).

Una vez adquirida esta bacteria es capaz de diseminarse a diferentes tejidos como el tracto urinario, tracto gastrointestinal, tracto vaginal, nasofaringe y orofaringe, provocando infecciones en vías urinarias (UTIs), infecciones vaginales, neumonía, bacteremia y en ocasiones meningitis (Remya, *et al.*, 2019). Incluso se han encontrado cepas de *K. pneumoniae* en la piel, pero se ha considerado como una infección transitoria (Martin y Bachman, 2018).

Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* están asociadas a una mortalidad alta, sin embargo, las tasas de mortalidad y morbilidad son variables, pues dependen de factores como la edad y condición de salud de cada persona, siendo particularmente un problema para neonatos, ancianos y personas inmunodeprimidas (Paczosa y Meccas, 2016). En general, los pacientes mayores a 40 años que padecen síndromes de inmunodeficiencia o presentan una enfermedad crónica como diabetes mellitus, obstrucción pulmonar crónica, insuficiencia renal, etcétera, son los principales afectados por esta bacteria (Dehshiri, *et al.*, 2018).

Al ser una especie que afecta principalmente a mamíferos, la colonización de *K. pneumoniae* en animales domésticos, además de causar un daño en la producción ganadera, también representan un peligro potencial debido a que estos animales actúan como reservorios genéticos de cepas de *K. pneumoniae* multidrogoresistente (Cheng, *et al.*, 2018).

Resistencia antimicrobiana

Los antibióticos son sustancias capaces de actuar sobre microorganismos para inhibir su reproducción o eliminarlos. Estos, desde su aparición en la farmacéutica se han convertido en elementos clave para tratamiento de una amplia variedad de enfermedades infecciosas, disminuyendo de forma significativa la morbilidad y mortalidad asociada a estas patologías, además que gracias a ellos se ha permitido realizar con éxito algunos procedimientos como trasplantes, quimioterapia, entre otras (Miranda-Navales, *et al.*, 2020; Alvo, *et al.*, 2016).

Los antibióticos se pueden clasificar de acuerdo con su composición química y mecanismos de acción, ya que cada familia posee características propias, además que hay algunos que inhiben el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos) y otros que lo eliminan (bactericida) (Alvo, *et al.*, 2016). Uno de los grupos más importantes de antibióticos son los betalactámicos que inhiben la síntesis de la pared celular de la bacteria, dentro de este grupo se incluyen a las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (Suárez y Gudiol, 2009; Tabla 1).

Tabla 1. Antibióticos betalactámicos y espectros de acción antimicrobiana (Alvo, *et al.*, 2016).

Betalactámicos	
1. Penicilinas	
Naturales (Ej: penicilina V)	Gram (+) aerobios y anaerobios no productores de betalactamasas <i>Enterococo</i> <i>Neisseria</i>
Resistentes a penicilinasas (Ej: doxacilina)	Estafilococos y estreptococos
Aminopenicilinas (Ej: amoxicilina, ampicilina)	Aumento del espectro hacia Gram (-) no productores de betalactamasas
Carboxi, indanil y ureido penicilinas (Ej: ticarcilina, piperacilina)	Cubre además algunos Gram (-) productores de betalactamasas Algunos cubren algunas cepas de <i>P aeruginosa</i>
2. Cefalosporinas	
Primera generación (Ej: cefadroxilo, cefazolina)	Gram (+)
Segunda generación (Ej: cefuroxino, cefaclor)	Se agrega cobertura para algunos Gram (-)
Tercera generación (Ej: ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima)	Igual al anterior Penetración a SNC Algunos cubren <i>P. aeruginosa</i>
Cuarta y quinta generación (Ej: cefepime, ceftarolina)	Agregan mayor estabilidad a betalactamasas y/o cobertura a SAMR
3. Carbapenémicos (ej: meropenem, imipenem, ertapenem)	
Gram (+) Bacilos Gram (-) entéricos Anaerobios Algunos cubren <i>P. aeruginosa</i> y <i>A. baumannii</i>	

El uso indiscriminado de los antibióticos, tanto para uso humano, como veterinario y agrícola ha ocasionado con el tiempo la selección de bacterias multidrogo-resistentes (Calderón y Aguilar, 2016). La transferencia horizontal de genes de resistencia a los antibióticos mediados por plásmidos, transposones e integrones, facilita la diseminación de la resistencia bacteriana, y por ende la agudeza o cronicidad de las infecciones. En la tabla 2 se observan los principales grupos de antibióticos y los mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias.

Tabla 2. Mecanismos de resistencia de acuerdo con el tipo de antibiótico.

ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	MECANISMO DE RESISTENCIA
1. b-LACTÁMICOS <ul style="list-style-type: none"> • Penicilinas • Cefalosporinas • Carbapenemes • Monobactámicos • Sulbactam y ácido clavulánico 	Inhibición de la síntesis de la pared celular (el peptidoglucano).	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de betalactamasas (<i>blashv</i>, TEM). • Mutación de pbps. • Baja penetración.
2. POLIPÉPTIDOS: <ul style="list-style-type: none"> • Bacitracina • Polimixina b, colistina 	Alteración de la membrana celular de gramnegativas, acción detergente.	<ul style="list-style-type: none"> • Baja penetración • Mutación del polisacárido
3. AMINOGLUCÓSIDOS <ul style="list-style-type: none"> • Estreptomina • Gentamicina • Neomicina • Kanamicina 	Inhiben síntesis de proteínas al unirse/ subunidad ribosomal 30 s	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación del sitio de unión en el ribosoma • Baja penetración • Modificación enzimática (acetilación, fosforilación) <i>aac (3)I-IV (GE)</i>, <i>aadA</i> (estreptomina)
4. TETRACICLINAS	Inhiben síntesis de proteínas al unirse/ subunidad ribosomal 30 s	<ul style="list-style-type: none"> • Detoxificación enzimática (<i>tea</i> y <i>tetb</i>) • Baja penetración
5. CLORANFENICOL	Inhiben síntesis de proteínas al unirse / subunidad ribosomal 50 s	<ul style="list-style-type: none"> • Modificación enzimática (<i>cat1</i> y <i>cmla</i>) (Acetiltransferasa)
6. MACRÓLIDOS <ul style="list-style-type: none"> • Eritromicina • Lincomicina • Clindamicina • Claritromicina 	Inhiben síntesis de proteínas al unirse / subunidad ribosomal 50 s	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación del sitio de unión en el ribosoma.

7. QUINOLONAS <ul style="list-style-type: none"> • Ac. Nalidíxico • Pefloxacina • Norfloxacina • Ciprofloxacina 	Inhiben actividad de la DNA girasa afectando replicación del DNA.	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación de la subunidad alfa de la ADN girasa (<i>qnr</i>) • Disminución de la captación
8. RIFAMPICINA, RIFABUTINA	Actúan sobre la RNA polimerasa, inhibiendo la transcripción.	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación de la RNA polimerasa
9. SULFONAMIDAS Y TRIMETOPRIM	Inhiben síntesis del ácido fólico que participa en síntesis de purinas.	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco (<i>sul</i> y <i>dfra</i>)

Klebsiella pneumoniae es un patógeno importante que frecuentemente es multidrogoresistente, debido a que acarrea numerosos genes de resistencia a los antimicrobianos, como a cefalosporinas y fluoroquinolonas, además de los carbapenémicos que son aquellos típicamente utilizados para cepas multidrogoresistentes en pacientes hospitalizados (Vargas *et al.*, 2019; Salazar-Holguin y Cisneros-Robledo, 2016; Theuretzbacher *et al.*, 2021). Debido a que cada vez disminuye más los antimicrobianos efectivos para infecciones provocadas por microorganismos multirresistentes, las polimixinas son considerados tratamientos de última línea sobre todo en infecciones graves por *K. pneumoniae* (Naomi-Matsuoka *et al.*, 2020).

Mecanismos de resistencia

Los antibióticos betalactámicos fueron durante años la primera línea de defensa contra infecciones bacterianas gracias a que inhiben la biosíntesis de la pared celular (Figura 1). Sin embargo, actualmente uno de los mecanismos primarios de resistencia en bacterias Gramnegativas es la producción de enzimas β -lactamasas, que son capaces de unirse al grupo carbonilo del anillo β -lactámico e hidrolizar su enlace (Liakopoulos *et al.*, 2016).

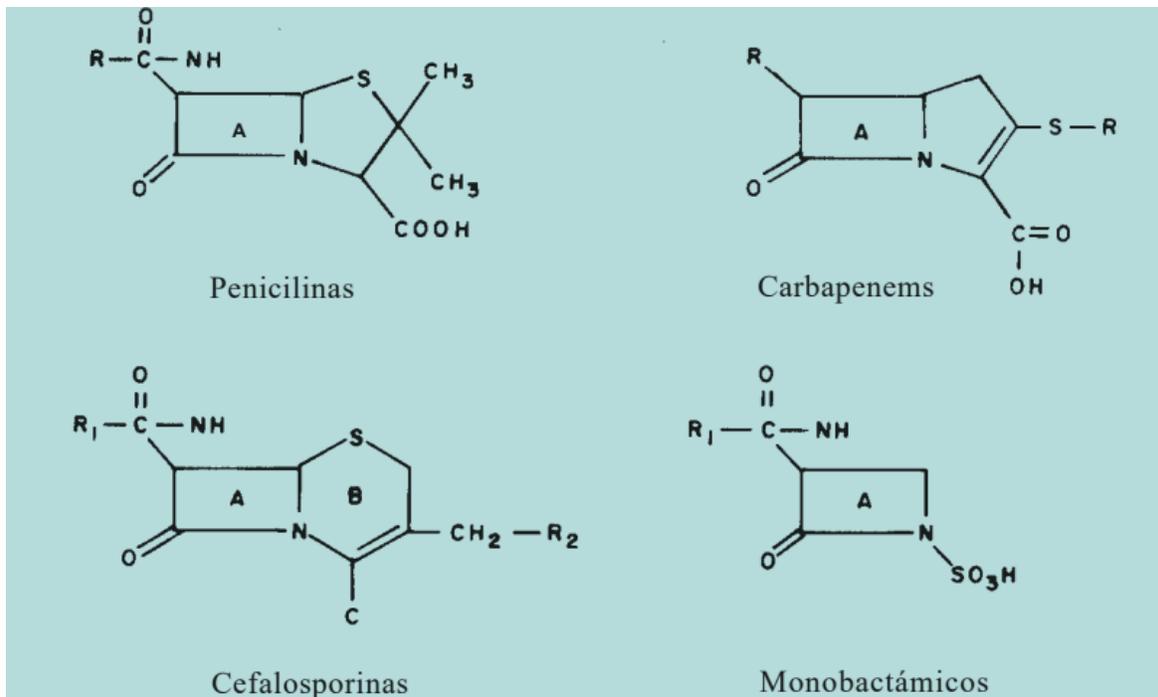


Figura 1. Estructura química de los antibióticos betalactámicos. (Tomada de: Gúzman *et al.*, 2004).

La producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs), es uno de los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos que han sido observados en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Estas son enzimas bacterianas mediadas por plásmidos que frecuentemente contienen otros genes de resistencia, dichas enzimas han sido encontradas en bacterias entéricas Gramnegativas contribuyendo de manera muy importante en la patogenicidad de organismos causantes de infecciones nosocomiales (Li *et al.*, 2015).

Existen nueve diferentes familias de β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs) clasificadas de acuerdo con sus secuencias de aminoácidos, siendo TEM (Temoneira) y SHV (Sulfhídrico Variable) las betalactamasas más prevalentes. El plásmido de SHV-1 fue detectado en una cepa de *K. pneumoniae* aislada de materia fecal de un neonato, este mostraba resistencia a penicilinas (especialmente ampicilina y carbenicilina) y cefalosporinas (Li *et al.*, 2015; Liakopoulos *et al.*, 2016; Cooney *et al.*, 2014).

En los últimos años, *Klebsiella pneumoniae* ha desarrollado nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos, por medio de una nueva clase de enzimas bacterianas (KPCs) capaces de inactivarlos e hidrolizar cefalosporinas y monobactámicos. Se ha reportado la transferencia de estos genes en plásmidos a otras especies de enterobacterias como *Enterobacter*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *Serratia marcescens* (Cooney *et al.*, 2014). Así como las bacterias se encuentran en constante evolución desarrollando nuevos mecanismos de resistencia, también ha representado una gran preocupación para el desarrollo de nuevos antibióticos.

Factores de virulencia

La capacidad de las bacterias para modificar su virulencia y diseminarse en el hospedero, forma parte de un proceso evolutivo. Así algunas cepas incrementan su virulencia gracias a la adquisición de un gran número de factores de virulencia (Yinec *et al.*, 2020).

La patogenicidad de *K. pneumoniae* se debe a los diferentes genes de virulencia que posee (Tabla 3), que incluyen adhesinas; *fimH-1* (type-1 fimbriae), *mrkD* (type3 fimbriae), *kpn* (fimH-like adhesin), *ycfM* (serum resistance-associated outer membrane lipoprotein), involucradas en la adhesión a células epiteliales y formación de la biopelícula, sistemas de adquisición de hierro; *entB*; (enterobactin), *iutA* (aerobactin), *irp-1* (yersiniabactin biosynthesis gene), *irp-2* (siderophore promotes biofilm), *ybtS* (siderophore protein), *fyuA* (yersiniabactin receptor gene), *iroN* (salmochelins receptor), protectinas o invasinas; *magA* (mucoviscosity-associated gene A) específico del serotipo capsular K1, y *rpmA* (regulator of mucoid phenotype A) y toxinas; *hlyA* (α -haemolysin) y *cnf-1* (cytotoxic necrotizing factor-1) (El Fertat *et al.*, 2013). Muchos de estos genes pueden ser transferidos horizontalmente entre las bacterias mediante islas de patogenicidad (PAIs) (Munkhdelger *et al.*, 2017; Chittò *et al.*, 2020).

Tabla 3. Factores de virulencia en *Klebsiella pneumoniae*.

GEN	NOMBRE	FUNCIÓN
<i>fimH-1</i>	Type-1 fimbriae	Adhesinas
<i>mrkD</i>	Type-3 fimbriae	
<i>kpn</i>	FimH-like adhesin	
<i>ycfM</i>	Serum resistance-associated outer membrane lipoprotein	
<i>entB</i>	Enterobactin	Sistemas de captación de hierro
<i>iutA</i>	Aerobactin	
<i>irp-1</i>	Yersiniabactin biosynthesis gene	
<i>irp-2</i>	Siderophore promotes biofilm	
<i>ybtS</i>	Siderophore protein	
<i>fyuA</i>	Yersiniabactin receptor gene	
<i>iroN</i>	Salmochelina receptor	
<i>magA</i>	Mucoviscosity-associated gene A	Protectinas
<i>rpmA</i>	Regulator of mucoid phenotype A	
<i>hlyA</i>	α -haemolysin	Toxinas
<i>cnf-1</i>	cytotoxic necrotizing factor-1	

La aparición de variantes hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKpn) con fenotipo hiper mucoviscoso (HM) (Figura 2) se ha extendido por todo el mundo (Russo *et al.*, 2019). Varios factores de virulencia se han asociado con cepas de hvKpn, incluidos los serotipos capsulares K1 y K2, y el gen A asociado a la mucoviscosidad (*magA*) y regulador de los genes del fenotipo A mucoide (*rmpA*) (Cubero *et al.*, 2019). La expresión de estos genes contribuye a la evasión del sistema inmune del hospedero y a la invasión tisular que juegan ciertos roles en las diferentes infecciones causadas por *K. pneumoniae* (Cubero, 2015; Paczosa y Meccas, 2016).

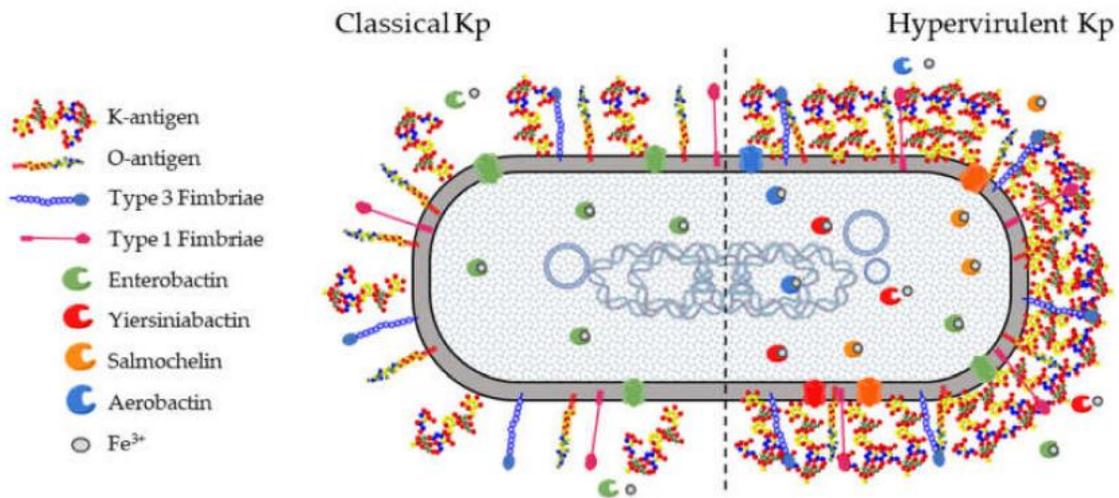


Figura 2. Diferencia de factores de virulencia en cepas de *Klebsiella pneumoniae* normales e hipervirulentas. (Tomado de: Arato *et al.*, 2021).

Cápsula

La cápsula es una estructura superficial formada por polisacáridos que recubre a la bacteria, formada por repeticiones de oligosacáridos de manosa, ramnosa, galactosa y piruvato, además de ácidos urónicos que favorecen el tamaño capsular. Durante la infección por *K. pneumoniae* la cápsula la protege contra la respuesta inmune del hospedero como la fagocitosis por las células inmunitarias (Paczosa y Meccas, 2016).

Esta estructura es una de las principales características de esta especie y ha permitido clasificarlas en serotipos según el antígeno capsular (antígeno K) que presentan (Yinec *et al.*, 2019). Los experimentos realizados en animales de laboratorio han corroborado que las bacterias que no poseen cápsula no provocan ningún tipo de infección, además que son más fáciles de identificar y destruir por el sistema inmunológico.

Existen cepas de *Klebsiella pneumoniae* que producen una hipercápsula, y son conocidas como hiper mucoviscosas, ya que presentan una cubierta mucoviscosa formada por exopolisacáridos que es más gruesa de la cápsula normal. Esta hipercápsula contribuye significativamente a la patogenicidad de esta bacteria. Los

genes que codifican para la producción de la cápsula están ubicados en el operón cromosomal *cps* (Paczosa y Meccas, 2016).

Se ha estudiado que el fenotipo hipermucoviscoso de cepas de *Klebsiella pneumoniae* está relacionado con la expresión en conjunto de dos principales genes de protectinas: el gen *magA* (mucoviscosity associated gene) y el gen *rmpA* (regulator of mucoid phenotype) (Cubero *et al.*, 2015).

El fenotipo hipermucoviscoso se encuentra principalmente asociado al gen *magA* (mucoviscosity associated gene) característico del serotipo K1 (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013). Este gen asociado a la mucoviscosidad ha sido detectado en cepas de pacientes con absceso hepático, además de proveer cierta resistencia a la fagocitosis (Zamani *et al.*, 2013).

rmpA (regulator of mucoid phenotype) es un gen regulador transcripcional transferido por plásmidos y está asociado a la regulación de la producción de la cápsula (Paczosa y Meccas, 2016). Se ha establecido a *rmpA* como un factor independiente asociado a la expresión del fenotipo de hipermucoviscosidad, por ello, es un factor que incrementa la patogenicidad de las cepas (Yu *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2018).

Lipopolisacárido (LPS)

En las bacterias Gramnegativas, la mayor parte de la pared celular está conformada por la membrana externa. Esta membrana es una segunda bicapa lipídica, sin embargo, esta no sólo se conforma de fosfolípidos y proteínas, sino que contiene también polisacáridos y lípidos, estos componentes forman un complejo por el cual recibe el nombre de Lipopolisacárido (LPS) (Madigan *et al.*, 2015).

La función principal del LPS es aportar resistencia a la célula, sin embargo, una propiedad biológica muy importante es su toxicidad para los animales. Esta toxicidad es atribuida particularmente al lípido A, una endotoxina que puede causar síntomas fuertes en humanos (Remya *et al.*, 2020; Madigan *et al.*, 2015).

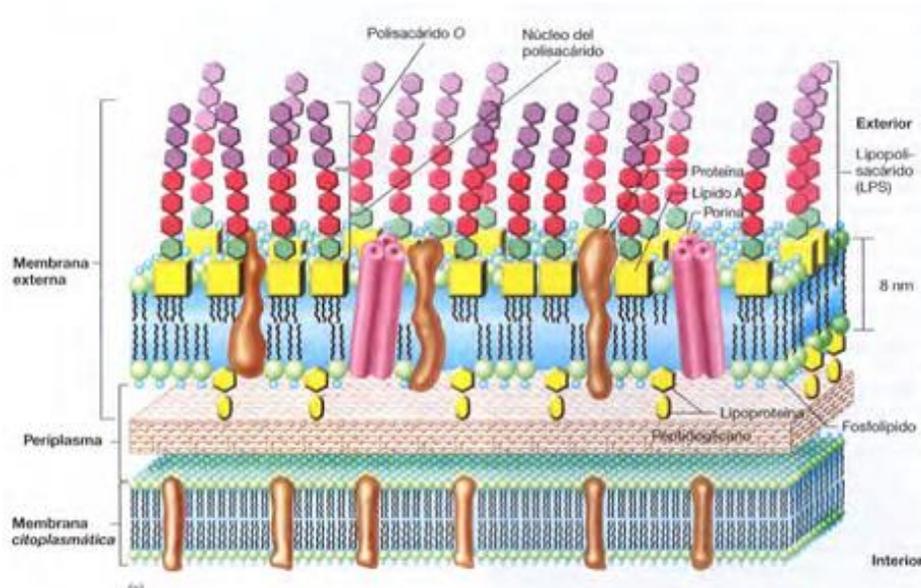


Figura 3. Estructura de pared celular en bacterias Gramnegativas (Tomado de: Madigan, et al., 2015)

La producción de esta estructura es regulada por el gen uridina-difosfato galacturonato 4-epimerasa (*uge*). Este gen está presente en la mayoría de las cepas aisladas, sin embargo, en ausencia de este gen, *K. pneumoniae* es menos probable que pueda causar infecciones en tracto urinario, neumonía y sepsis (Remya *et al.*, 2020). Se ha observado que el gen *ycfM* (outer membrane lipoprotein) codifica para la lipoproteína de la cápsula, además de que promueve la resistencia a la fagocitosis.

Fimbrias

Las fimbrias son proteínas filamentosas que se encuentran en la superficie de una célula y pueden cumplir con diversas funciones. Las fimbrias permiten a las células bacterianas adherirse a diferentes superficies y tejidos o incluso a formar biopelículas (Madigan, *et al.*, 2015).

En *Klebsiella pneumoniae* las fimbrias tipo 1 y 3 son las principales estructuras de adhesión que han sido caracterizadas como factores de patogenicidad. La fimbria de tipo 1 es delgada en forma de protuberancias en la superficie celular de la bacteria y es encontrada en el 90% de las cepas, ya sea en el medio ambiente o clínicas. La fimbria tipo 3 son filamentos en forma de hélice, a diferencia de la fimbria tipo 1, esta no es sensible a la manosa, por lo cual no puede unirse a ella (Paczosa y Mecsas, 2016).

Actualmente se conoce la función e importancia de algunos genes relacionados con la capacidad de adhesión de *Klebsiella pneumoniae* al hospedero, y recientemente estos han sido más estudiados. El gen *fimH* (type-1 fimbriae) y *kpn* (fimH-like adhesin) tienen un papel importante en las infecciones del tracto urinario causadas por *K. pneumoniae* además de estar involucrados en la formación de biopelículas; la función del gen *mrkD* (type-3 fimbrial adhesin protein) como factor de virulencia no es muy específico, sin embargo, se ha observado su participación para inducir la formación de biopelículas (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013; Ikeda *et al.*, 2018; Gołębiewska *et al.*, 2019).

Biopelículas

Las bacterias suelen unirse a superficies sólidas, en cuanto tienen oportunidad, formando una capa gruesa de células llamada biopelícula, una estructura tridimensional que se encuentra en una matriz de polisacáridos extracelulares que le permite la adhesión al hospedero. Esta estructura no sólo tiene la función de adhesión, sino que también impide que las células se deshidraten y actúa como factor de virulencia en determinadas enfermedades bacterianas (Madigan *et al.*, 2015; Maldonado *et al.*, 2007).

La matriz en la que se encuentran los microorganismos protege a la biopelícula de la exposición a rayos ultravioleta, toxicidad por metales, exposición a ácidos, deshidratación, fagocitosis y acción de ciertos antimicrobianos. Debido a esto, la

presencia de biopelículas dificulta el tratamiento de enfermedades con fármacos convencionales (Moreno *et al.*, 2020).

Sideróforos

El hierro es un recurso limitado que requiere *Klebsiella pneumoniae* para sobrevivir y reproducirse, este se debe adquirir del medio. En esta medida el organismo tiene la necesidad que emplear diferentes tácticas para adquirir hierro, como lo son la secreción de proteínas captadoras de hierro llamadas sideróforos, que son pequeñas moléculas capaces de obtener hierro del hospedero. La producción de múltiples sideróforos ayuda a la bacteria a soportar la neutralización del hospedero (Paczosa y Meccas, 2016).

K. pneumoniae es portadora de los genes de captación de hierro: enterobactina (*entB*), yersiniabactina (*ybtS*), aerobactina (*iutA*) y salmoquelina (*ironN*). El más común es *entB*, no obstante, *ybtS* se sobreexpresa en cepas aisladas del tracto respiratorio y aerobactina es principalmente encontrado en cepas hipervirulentas ya que contribuye a su virulencia (Reyma *et al.*, 2020).

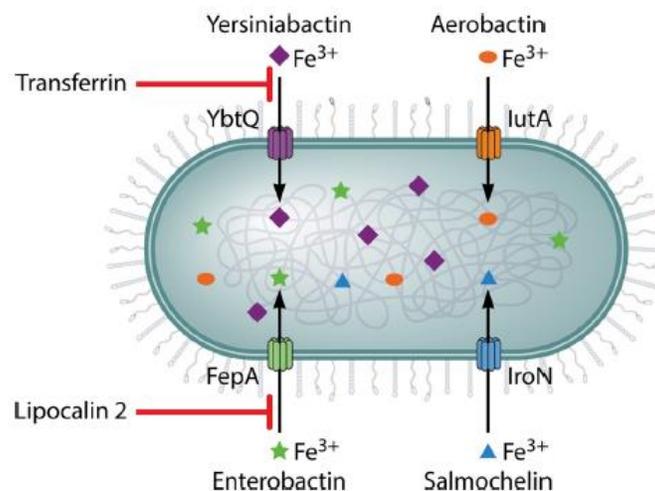


Figura 4. Producción de sideróforos y su papel en la virulencia de *Klebsiella pneumoniae* (Tomado de: Paczosa y Meccas, 2016).

Toxinas

Dentro de los factores de virulencia reportados en *Klebsiella pneumoniae* se encuentran genes que codifican para dos principales toxinas que son secretadas: la alfa hemolisina (*hlyA*) y el factor necrotizante tóxico (*cnf-1*).

La alfa hemolisina representa a una familia de proteínas producida por diferentes bacterias gramnegativas (Bakás *et al.*, 2013). La proteína hemolisina es una exotoxina producida por microorganismos que provoca la lisis de células sanguíneas: eritrocitos. Esta es considerada una causa importante de daño al hospedero, pues facilita la diseminación de la bacteria y como consecuencia el organismo del hospedero tiene una respuesta inflamatoria (Radi y Nadhim, 2018).

El factor citotóxico necrotizante (*cnf-1*) está ligado principalmente a cepas urovirulentas de *E. coli*, siendo expresado en aproximadamente 61% de cepas aisladas de infecciones en vías urinarias y 10% aisladas de materia fecal, sin embargo, se ha reportado que cepas de *Klebsiella pneumoniae* son portadoras de este factor, contribuyendo a su patogenicidad (Spurbeck, 2013). Algunos de los efectos provocados por *cnf-1* es la inhibición de la actividad fagocitaria de neutrófilos polimorfonucleares impidiendo la respuesta eficaz del sistema inmune del hospedero. Además, afecta a las células mediante la desamidación de GTPasas lo que facilita la invasión de células uroepiteliales (Visvikis *et al.*, 2011).

JUSTIFICACIÓN

Klebsiella pneumoniae es considerada una de las principales especies bacterianas causantes de enfermedades nosocomiales en Latinoamérica. En nuestro país los factores de virulencia de *K. pneumoniae* relacionados con la hipervirulencia han sido poco estudiados, por lo que es de gran interés analizar la expresión de genes de adhesinas y protectinas en cepas clínicas de *K. pneumoniae*.

ANTECEDENTES

En 2013 El Fertas-Aissani y colaboradores en Argel, Argelia detectaron los factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* en 54 cepas aisladas de diferentes especímenes clínicos. Caracterizaron, entre otros, los genes que codifican para adhesinas como *fimH-1*, *mrkD*, *kpn*, *ycfM* y aquellos que codifican para protectinas como *rmpA* y *magA*. Los resultados más importantes que obtuvieron fueron para las adhesinas *fimH-1* (100%), *mrkD* (96.3%) e *ycfM* (96.3%), seguido de *kpn* (63%); y en menor cantidad para las protectinas *rmpA* (3-7%), *magA* no fue detectado. Estos autores concluyeron que las adhesinas contribuyen a la patogenicidad de *K. pneumoniae*.

Gołębiewska y colaboradores (2019) en Gdansk, Polonia aislaron cepas de *K. pneumoniae* a partir de muestras de orina de pacientes hospitalizados con infecciones altas y bajas del tracto urinario y detectaron los factores de virulencia (*fimH-1*, *kpn*, *ycfM*, *mrkD*, *rmpA*, *magA*) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). No se encontró asociación alguna entre los factores de virulencia y el desarrollo de infecciones altas y bajas del tracto urinario, sin embargo, se observó que la inmunosupresión puede influir en la agudeza de las infecciones.

En el trabajo realizado en Japón durante 2018 por Ikeda y colaboradores, analizaron 130 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, obtenidas de esputo y orina de pacientes portadores, encontraron que sólo 49 de ellos presentaron infección. A partir de las 130 cepas, el 19.2% fue agrupada dentro de algún serotipo capsular, mientras que el 25.4% mostró hipermucoviscosidad. La prevalencia de los genes asociados a la hipermucoviscosidad *magA*, *rmpA* y *mrkD* en las cepas fue de 10%, 16.9% y 85.4%, respectivamente, sin embargo, los resultados mostraron que sólo *rmpA* fue significativamente más frecuente en casos de infección que en pacientes asintomáticos, lo cual sugiere que *rmpA* tiene un papel importante en el desarrollo de infecciones urinarias y neumonía.

Cubero y colaboradores (2015) durante siete años en Barcelona, España estudiaron la frecuencia y la epidemiología clínica y molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes que presentaban bacteriemia. El 5.4% presentó

el fenotipo de hipermucoviscosidad, de estas, 30.2% presentaron *magA* y *rmpA*, 22.6% presentó sólo *rmpA* y el 47.2% restante no acarrió ninguno de los dos genes. Los pacientes con cepas portadoras de ambos genes de hipermucoviscosidad desarrollaron abscesos hepáticos piógenos más frecuentemente.

En Barcelona, España, Cubero y colaboradores (2019) reevaluaron la asociación del fenotipo hipermucoviscoso con la presencia de genes de adhesión y la formación de biopelícula en cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*. Las cepas pertenecientes al serotipo capsular K1 presentaron menor adhesión a pesar de portar los genes *mrkD* y *fimH*, pero presentaron mayor capacidad para formar biopelículas que los serotipos K2 o los no K1/K2. La formación de biopelícula podría incrementar la resistencia a los antibióticos y a la fagocitosis de las cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*.

En el 2019, Vargas y colaboradores analizaron los patrones clínicos, epidemiológicos y moleculares de cepas de *K. pneumoniae* hipermucoviscosas resistentes a carbapenémicos aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales en un hospital de Tucumán Argentina. Encontraron frecuencias variables en los diferentes factores de virulencia: aquellos que codifican para las adhesinas (*fimH*, *mrkD*) se encontraron en un 97.1%, para sideróforos en 94.3% y para resistencia a fagocitosis por *ycfM* en un 57.1%.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar los genes de adhesión y de protectinas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias, urinarias y bacteremia.

Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de los genes de adhesión *fimH* (type-1 fimbriae), *kpn* (fimH-like adhesin), *mrkD* (type-3 fimbrial adhesin protein), e *ycfM* (serum resistance-associated outer membrane lipoprotein) en las cepas.
- Establecer la frecuencia de los genes de protectinas *magA* (mucoviscosity-associated gene A) y *rpmA* (regulator of mucoid phenotype A).
- Comparar la expresión de los genes de adhesión y de protectinas por PCR en tiempo real después del crecimiento bacteriano en dos diferentes caldos nutritivos de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y resiembra de las muestras

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (n=5) fueron previamente aisladas de un grupo de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Hospital General Regional (HGR) no. 72 y de la clínica 64 de Tequexquináhuac, Tlalnepantla de Baz, Edo. Méx. Se obtuvo información de los pacientes como su edad, sexo y diagnóstico (infección en vías urinarias, infección cervico-vaginal, infección respiratoria y bacteremia). Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y la cepa control (ATCC 700721) se encuentran almacenadas en medio BHI (infusión cerebro-corazón) más glicerol en el Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FES Iztacala, UNAM.

Extracción del DNA

Se tomó un inóculo de las cepas y del control por medio de un asa estéril a partir del medio de cultivo BHI más glicerol, se sembró por separado en 2 mL de BHI y se incubó a 37° C durante 24 horas. Se tomó un inóculo de las muestras por medio de un asa estéril y se sembró por el método de estría cruzada en agar Mueller-Hinton (MH) y se incubó a 37° C por 24 horas. A partir del crecimiento bacteriano, se tomaron varias colonias con un asa estéril que se depositaron en 2 mL de agua desionizada estéril contenida en un tubo con tapón de rosca 16 x 150. Posteriormente se agitó en un vórtex por 30 seg y se llevó a punto de ebullición, al cabo de 20 min se colocó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA, y se almacenó en un tubo eppendorf estéril a -20°C hasta su utilización.

Identificación de *K. pneumoniae*

Se identificó la especie bacteriana de *K. pneumoniae* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) amplificando la secuencia del espaciador interno transcrito (ITS) del gen 16-23S rRNA (Liu *et al.*, 2008) con los siguientes oligonucleótidos: *K. pneumoniae* Pf ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT y *K. pneumoniae* Pr1 TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC. El tamaño del amplicón fue de 130 pb. En un tubo eppendorf de 200 µL y para un volumen final por mezcla de reacción de 20 µL

se agregó 1 μL de cada oligonucleótido (Forward y Reverse, 10 pmol; INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES), 12 μL del kit Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED (AMPLIQON, Copenhagen Denmark's), 3 μL de agua libre de nucleasas y 3 μL de DNA molde. La desnaturalización inicial fue de 3 min a 94° C, después continuaron 30 ciclos de desnaturalización por 30 seg a 94°C, alineación 30 seg a 58°C y extensión 45 seg a 72°C. La extensión final fue por 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron corridos en una electroforesis en gel de agarosa para detectar la presencia del gen.

Análisis por electroforesis en gel de agarosa

Se preparó una solución stock concentrada 10X de Tris-borato (TBE) conformada por 108 gr de Tris base, 40 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0), 55 gr de ácido bórico y se aforó a 1 L con agua destilada. A partir de esta solución se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración de TBE 1X necesaria para realizar la electroforesis. El gel de agarosa se preparó al 2% en 100 mL de TBE 1x, se agregó 0.5 μL de Midori Green (como fluorescente) por cada 100 mL de agarosa. La agarosa se depositó en un contenedor para formar los pozos. Una vez gelificada la agarosa, se introdujo en la cámara de electroforesis junto con el TBE 10X hasta cubrir el gel. Se depositaron 5 μL de los amplicones de PCR en los pozos y 3 μL del marcador de peso molecular en su pozo correspondiente. Se corrió el gel a 120 volts, 94 mA durante 30 min.

Detección de genes de virulencia por PCR

Los genes de adhesinas *fimH* (type-1 fimbriae), *kpn* (fimH-like adhesin), *mrkD* (type-3 fimbrial adhesin protein), *ycfMb* (outer membrane lipoprotein), y los genes de protectinas (hipermucoviscosidad) *rmpA* (regulator of mucoid phenotype) y *magA* (mucoviscosity associated gene) de *K. pneumoniae* fueron identificados por PCR de acuerdo con lo descrito por El Fertas Aissani *et al.*, (2013).

Para amplificar cada gen, en un tubo eppendorf de 200 μL se agregó 1 μL de cada oligonucleótido (Forward y Reverse, 10 pmol; INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES) (Tabla 4), 12 μL del kit Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED

(AMPLIQON, Copenhagen Denmark's), 3 µL de agua libre de nucleasas y 3 de DNA molde. La desnaturalización inicial fue de 4 min a 94° C, después continuaron 30 ciclos de desnaturalización por 30 seg a 94°C, alineación por 40 seg a temperatura variable (Tabla 5) y extensión por 1 min a 72°C. La extensión final fue por 10 min a 72°C.

Tabla 4. Oligonucleótidos (Forward y Reverse) utilizados para la realización de PCR de acuerdo con los diferentes genes.

Gen	Función	Oligonucleótidos Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>fimH</i>	Adhesinas	ATGAACGCCTGGTCCTTTGC GCTGAACGCCTATCCCCTGC	688
<i>kpn</i>		GTATGACTCGGGGAAGATTA CAGAAGCAGCCACCACACG	626
<i>ycfM</i>		ATCAGCAGTCGGGTCAGC CTTCTCCAGCATTTCAGCG	160
<i>mrkD</i>		CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	240
<i>rmpA</i>	Protectinas	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGATGAGCCATCTTTCA	535
<i>magA</i>		GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1282

Tabla 5. Temperaturas de alineamiento utilizadas en la realización de PCR de acuerdo con los diferentes genes (El Fertas-Aissani, et al., 2013).

Gen	Temperatura (°C)
<i>fimH</i>	55
<i>kpn</i>	
<i>ycfM</i>	
<i>mrkD</i>	52
<i>rmpA</i>	50
<i>magA</i>	59

Extracción de RNAm a partir del cultivo bacteriano

Para la extracción de RNAm fue necesario promover la expresión de los genes de interés (adhesinas y protectinas), por lo que *K. pneumoniae* creció en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y caldo soya tripticaseína (ST) a 37°C durante 24 horas en agitación constante. Al término, se realizaron diluciones 1:5 en caldo BHI estéril hasta obtener una $DO_{600\text{ nm}} = 0.4$, lo que indicó una concentración de 1×10^9 células. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 2000 rpm por 3 minutos, al término la pastilla fue resuspendida en Buffer Fosfato Salino (PBS), posteriormente se agitaron en un vortex por 10 segundos y se centrifugaron (2000 rpm por tres minutos). Finalmente, se decantó el sobrenadante y la pastilla se utilizó para la extracción del ARN.



Figura 5. Equipo robotizado QIAcube con reactivos del kit comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany)

La extracción total de RNA se realizó con el kit comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el equipo robotizado QIAcube (Figura 5). Para lo cual, las pastillas bacterianas obtenidas de los cultivos fueron colocadas en la placa de agitación del equipo. Al mismo tiempo en la posición “A” de la sección correspondiente al buffer de lisis se colocó el buffer TE (solución preparada a pH de 8 con 10 Mm Tris-Cl, 1 Mm de EDTA y 1 mg/mL de lisozima). Después de alimentar el equipo QIAcube con los diferentes reactivos del kit RNeasy, se llenó el contenedor con puntas de 1 mL y se depositaron los tubos de columna y elución (extracción) en el carrusel (centrífuga) del equipo (Figura 5). Finalmente, el QIAcube se programó

para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida.

El equipo robotizado adicionó 100 μL de buffer TE (Tris-EDTA) a cada tubo con la pastilla celular bacteriana. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares. Posteriormente el robot QIAcube adicionó 350 μL de buffer RLT (amortiguador de pH de lisis con Isotiocianato de guanidina con 100 $\mu\text{l}/\text{mL}$ de β -mercaptoetanol) que permitió inactivar las RNAsas y favorecer la unión del RNA a la membrana de sílice de la columna utilizada en el QIAcube.

Al término el equipo adicionó 350 μL de etanol al 95% para homogeneizar el lisado, mezcló suavemente los tubos y transfirió 700 μL de la mezcla a la columna contenida en un tubo de 2 mL, centrifugó los tubos a 10 000 rpm durante 15 segundos y el líquido de flujo fue desechado. Después adicionó 700 μL del buffer de lavado RW1 (Cloruro de guanidina y etanol) a la columna, para la eliminación de biomoléculas no deseadas y centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos, nuevamente el líquido de flujo fue desechado. Al término el robot adicionó 500 μL de buffer RPE (amortiguador de pH de lavado con 4 volúmenes de etanol al 96%) a la columna que permitió eliminar los rastros desales, que todavía estaban en la columna debido a los buffers utilizados anteriormente en el protocolo y el equipo centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos para lavar la membrana, el líquido de flujo fue descartado. Nuevamente adicionó 500 μl de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos para volver a lavar la membrana y remover restos de sales, descartando nuevamente el líquido de flujo.

Finalmente, el robot movió y depositó la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL, centrifugó durante 1 minuto y el equipo adicionó 30 μL de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto para obtener el RNA. La concentración total del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Debido a la inestabilidad del RNA, inmediatamente se realizó la reverso transcripción a cDNA

Reversotranscripción

Se utilizó el equipo comercial QuantiTec Reverse Transcription (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó la eliminación de DNA genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 μ l se agregaron cada uno de los siguientes componentes: Para cada muestra se depositó en un tubo eppendorf 2 μ L de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 μ L de H₂O libre de RNAsas y 5 μ L de RNA molde. Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo.

Para la reverso transcripción se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA: 1 μ L de Quantiscript Reverse Transcriptasa®, 4 μ L Quantiscript RT buffer 5x®, 1 μ L RT Primer mix® y 14 μ L de RNA templado (obtenido de la reacción anterior) para un volumen final de reacción de 20 μ L. Posteriormente los tubos se incubaron a 42°C por 15 minutos. Para inactivar la transcriptasa reversa el tubo se incubó en un termoblock a 95°C durante 3 minutos.

La concentración total del cDNA se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para realizar la PCR en tiempo real, es necesaria una concentración mínima de 100 ng/mL, por lo cual se realizó una dilución 2:5 (20 μ L de cDNA y 30 μ L de agua libre de nucleasas). Al final se obtuvieron concentraciones de cDNA de aproximadamente 500 – 700 ng/ mL, que se almacenaron a -20°C hasta su utilización para PCR en tiempo real.

Expresión de marcadores de virulencia

Los oligonucleótidos utilizados para la expresión de los genes de virulencia fueron los mismos que se utilizaron para la identificación por PCR convencional. Se utilizó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene) (Figura 6). El volumen final por mezcla de reacción fue de 24 μ L: 12.5 μ L de la Master Mix SYBRGreen PCR (QIAGEN), 1 μ L del oligonucleótido Forward (10 pmol, INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES), 1 μ L del oligonucleótido Reverse (10 pmol), 9.5 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de cDNA templado (500 ng/ μ L).



Figura 6. Equipo para PCR en tiempo real Corbett® Rotor Gene.

Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización inicial 95° C por 5 min, 40 ciclos de desnaturalización 95°C por 5 seg, alineamiento y extensión 60° C por 10 seg. El control interno para cada ensayo fue el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana. La cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700721 se utilizó como control positivo en cada ensayo. La melting point (T_m) se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real para diferenciar los productos específicos e inespecíficos.

Análisis estadístico

Se realizó una χ^2 ($p < 0.05$) para identificar diferencias significativas entre la expresión de los genes de las cepas crecidas en medio de cultivo infusión cerebro-corazón (BHI) y en caldo de soya tripticaseína (ST).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Origen de las cepas

Se analizaron cinco cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas previamente de pacientes con infección respiratoria (n=2), infección cervicovaginal, (n=1), infección de vías urinarias (n=1) y bacteremia (n=1) del Hospital Regional No. 72 y de la Unidad de Medicina Familiar (UMF) No. 64 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). De las muestras analizadas el 80% (n=4) fueron mujeres y el 20% (n=1) hombres (Figura 7).

La edad de los pacientes infectados se encontró en el rango de 21 a 60 años (Figura 8). El rango de edad más abundante fue de 51-60 años con el 60% (n=3), seguidos por los de 21-30 y 31-40 con el 20% (n=1), en cada caso.

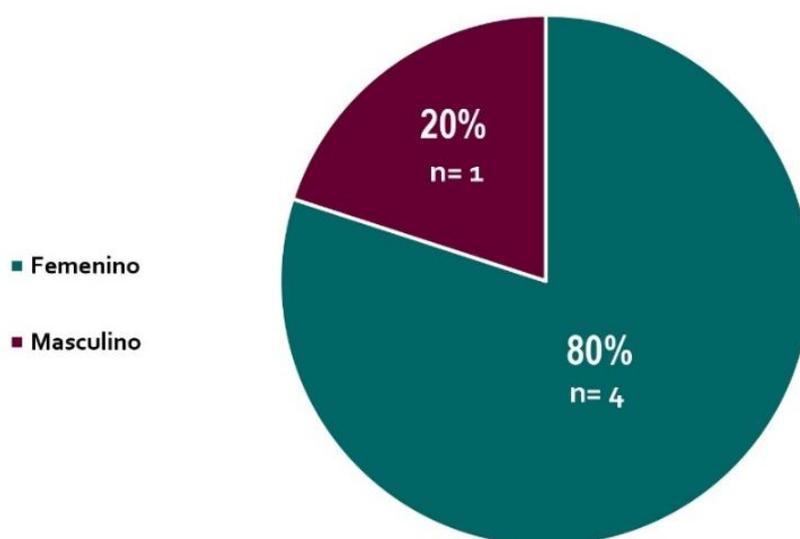


Figura 7. Distribución por sexo de los pacientes.

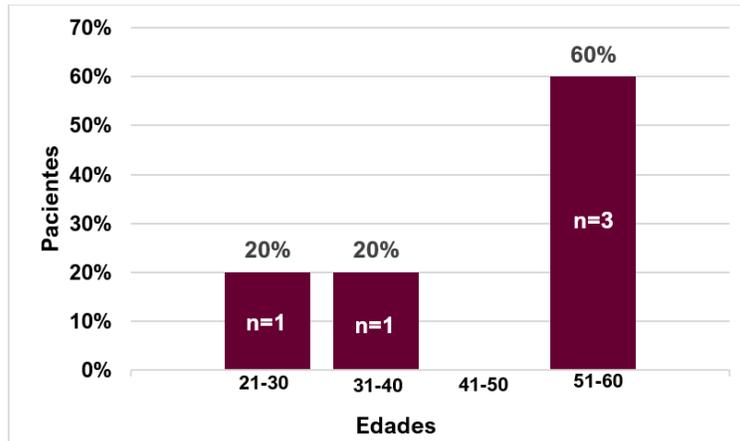


Figura 8. Distribución de los pacientes por rango de edad.

Identificación de *Klebsiella pneumoniae*

La identificación de las cinco cepas se realizó por PCR de punto final mediante la amplificación del gen 16-23S rRNA. El tamaño del amplicón fue de 130 pb (Figura 9).

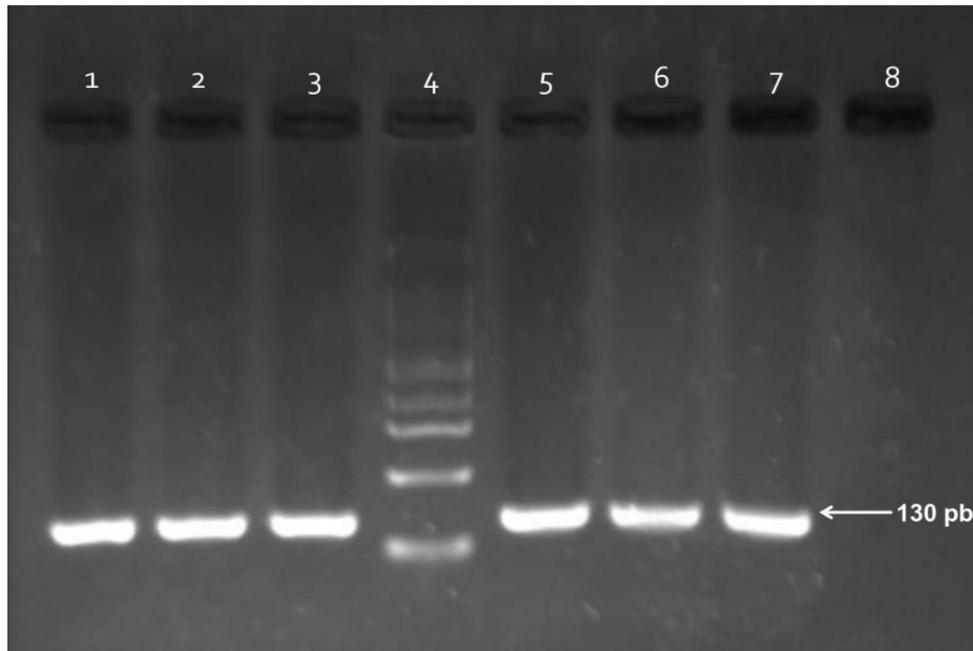


Figura 9. Detección de *K. pneumoniae* por PCR mediante amplificación del gen 16-23S rRNA (130 pb). Carriles 1-3 y 5-6: cepas de *K. pneumoniae* de pacientes. Carril 4: Marcador de peso molecular (MWM:100-pb). Carril 7: Control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

Frecuencia de los genes de virulencia de *K. pneumoniae* asociados a los diagnósticos clínicos de los pacientes.

En la tabla 6 se observa la distribución de los genes de virulencia *fimH-1* (Figura 10), *kpn* (Figura 11), *mrkD* (Figura 12), *ycfM* (Figura 13), *rmpA* (Figura 14) y *magA* (Figura 15) de *K. pneumoniae* (n= 5) según el diagnóstico clínico. El diagnóstico más frecuente fue la infección respiratoria con 40% (n=2), seguido de las infecciones cervicovaginales, infecciones en el tracto urinario (ITU) y bacteremia, cada uno con el 20% (n=1). Por otro lado, los genes *fimH-1*, *kpn* y *mrkD* con función de síntesis de adhesinas, se encontraron en el 100% de las cepas (n= 5), al igual que el gen *ycfM* relacionado con la formación de cápsula, mientras que *rmpA* y *magA* asociados con la hipermucoviscosidad, fueron encontrados en el 80% (n=4) y 60% (n=3) respectivamente.

Tabla 6. Frecuencia de los genes de virulencia en pacientes con diferentes diagnósticos.

Función	Gen	Infección respiratoria	Infecciones cervico-vaginales	Infecciones de vías urinarias	Bacteremia	Total
		n= 2 No. (%)	n= 1 No. (%)	n= 1 No. (%)	n= 1 No. (%)	n= 5 No. (%)
Adhesinas	<i>fimH-1</i>	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)
	<i>kpn</i>	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)
	<i>mrkD</i>	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)
Cápsula/ hipermuco- viscosidad	<i>ycfM</i>	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)
	<i>rmpA</i>	2 (100)	1 (100)	1 (100)	0	4 (80)
	<i>magA</i>	1 (50)	1 (100)	1 (100)	0	3 (60)

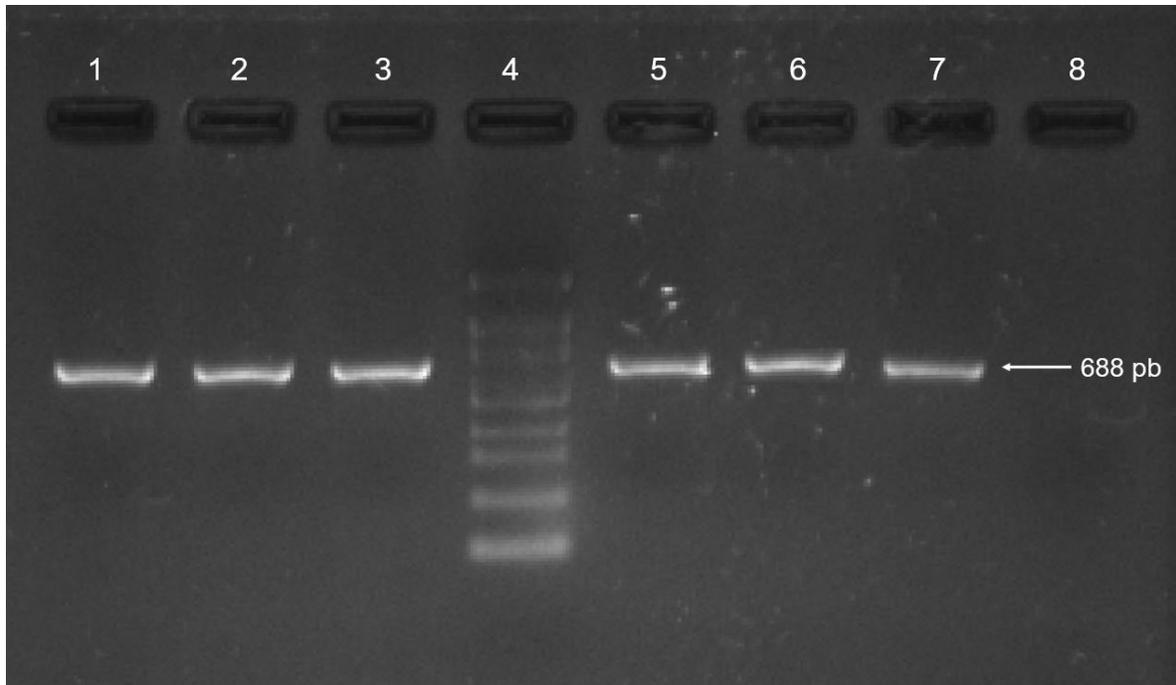


Figura 10. Detección por PCR del gen *fimH-1* (688 pb el amplicón) en cepas de *K. pneumoniae*. Carriles 1-3, 5 y 6: *fimH-1* en cepas de *K. pneumoniae* de pacientes. Carril 4: Marcador de peso molecular (MWM: 100-pb). Carril 7: Control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

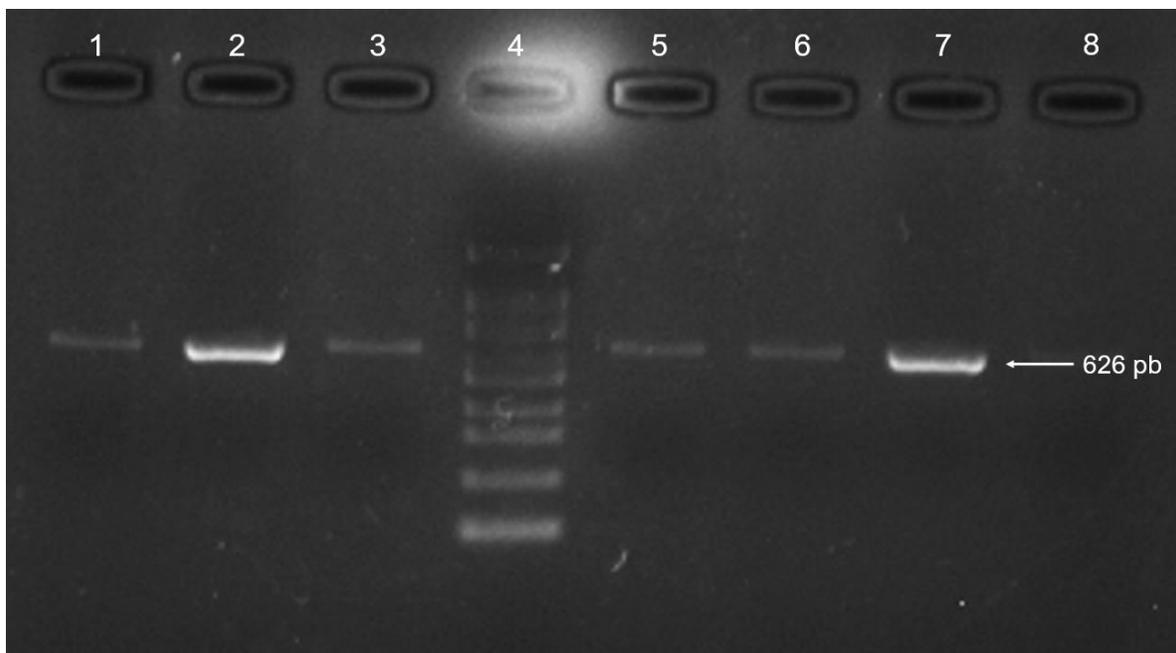


Figura 11. Detección por PCR del gen *kpn* (626 pb el amplicón) en cepas de *K. pneumoniae*. Carriles 1-3, 5 y 6: *kpn* en cepas de *K. pneumoniae* de pacientes. Carril 4: Marcador de peso molecular (MWM: 100-pb). Carril 7: Control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

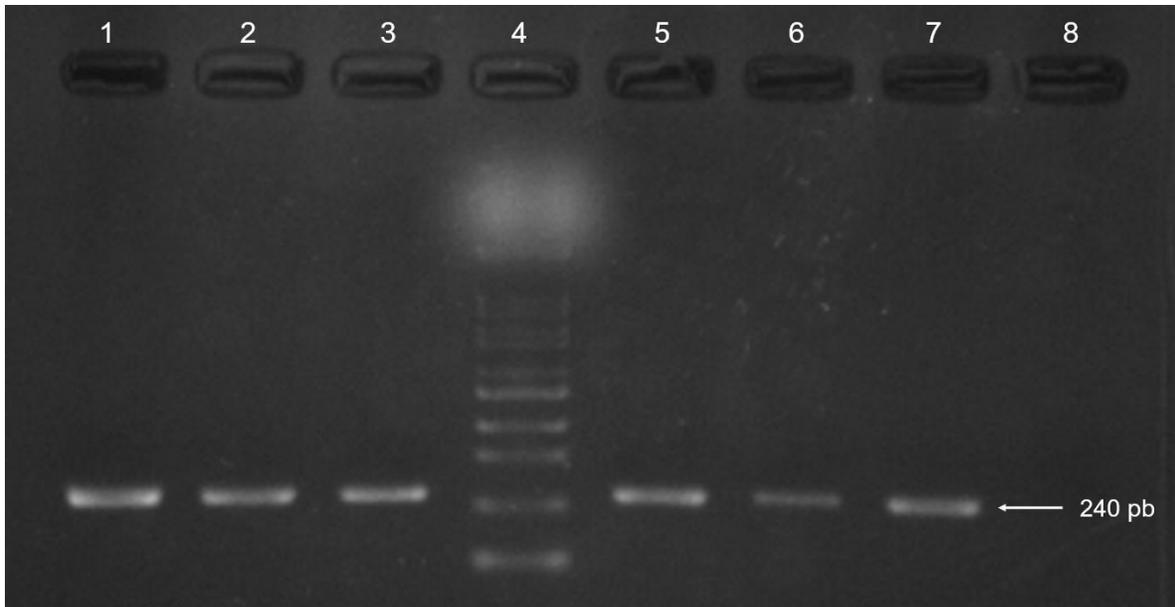


Figura 12. Detección por PCR del gen *mrkD* (240 pb el amplicón) en cepas de *K. pneumoniae*. Carriles 1-3, 5 y 6: *mrkD* en cepas de *K. pneumoniae* de pacientes. Carril 4: Marcador de peso molecular (MWM: 100-pb). Carril 7: Control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

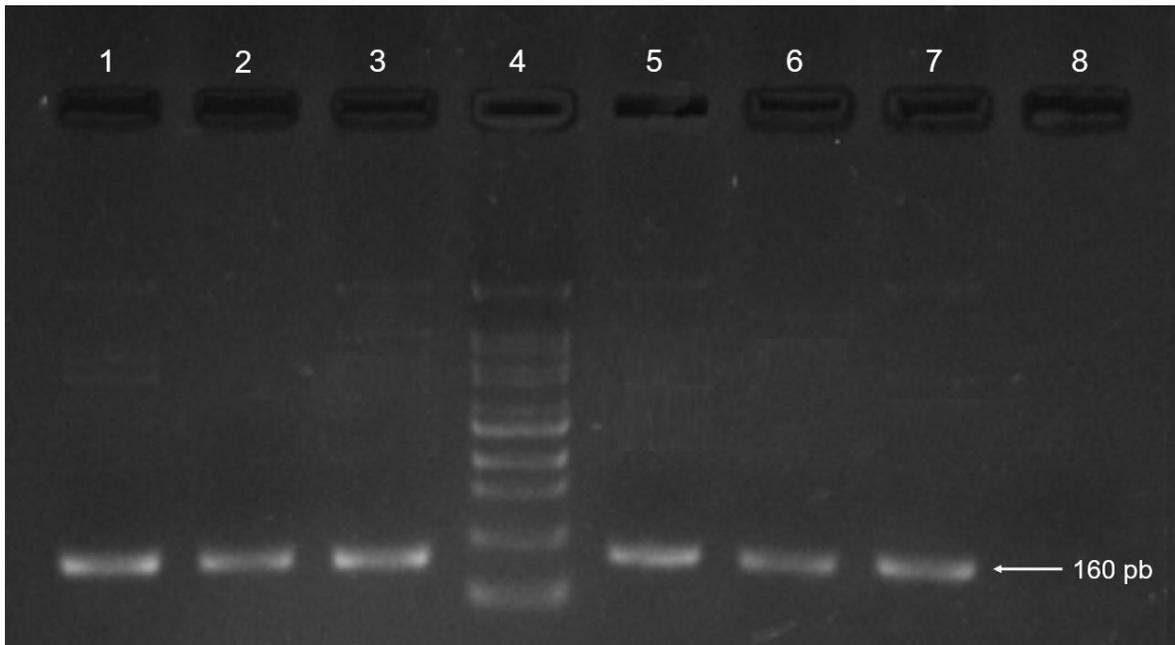


Figura 13. Detección por PCR del gen *ycfM* (160 pb el amplicón) en cepas de *K. pneumoniae*. Carriles 1-3, 5 y 6: *ycfM* en cepas de *K. pneumoniae* de pacientes. Carril 4: Marcador de peso molecular (MWM: 100-pb). Carril 7: Control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

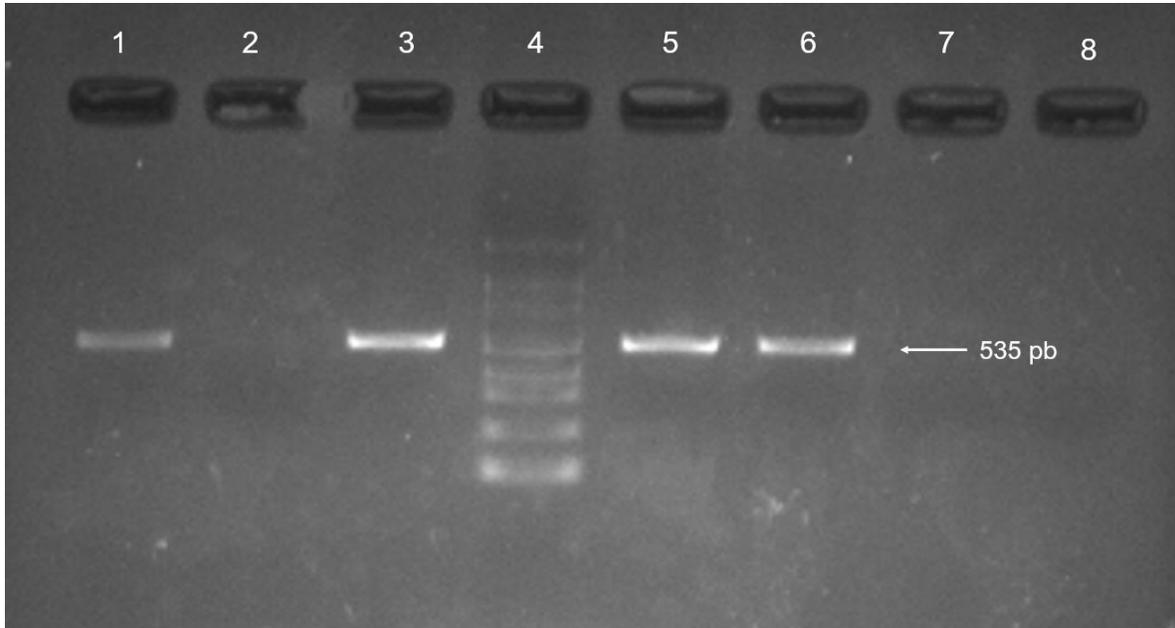


Figura 14. Detección por PCR del gen *rmpA* (535 pb el amplicón) en cepas de *K. pneumoniae*. Carriles 1, 3 y 5: *rmpA* en cepas de *K. pneumoniae* de pacientes. Carril 4: Marcador de peso molecular (MWM: 100-pb). Carril 2: Cepa negativa para el gen. Carril 6: Control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

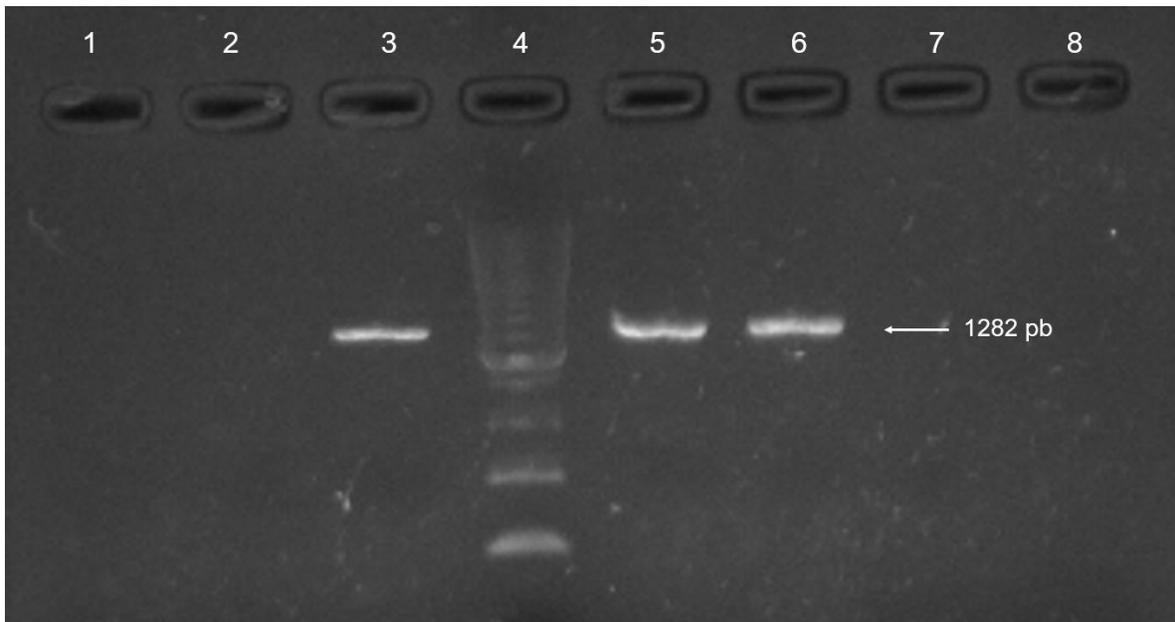


Figura 15. Detección por PCR del gen *magA* (1282 pb el amplicón) en cepas de *K. pneumoniae*. Carriles 3 y 5: *magA* en cepas de *K. pneumoniae* de pacientes. Carril 4: Marcador de peso molecular (MWM: 100-pb). Carril 1 y 2: Cepa negativa para el gen. Carril 6: Control positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700721). Carril 8: Control negativo (sin DNA molde).

Patrones de asociación

Como se observa en la tabla 7, se presentaron cinco patrones diferentes de asociación de los genes estudiados. El patrón No. 1 (*fimH/ycfM/kpn/mrkD/rmpA/magA*), conformado por los seis genes estudiados, se identificó en las cepas obtenidas de infección en vías urinarias (n=1) y cervico-vaginal (n=1). El patrón no. 2 (*fimH/ycfM/kpn/mrkD/rmpA*) se presentó en la cepa asociada a infección respiratoria (n=1). El patrón no. 3 presentó dos genes de adhesinas (*kpn* y *mrkD*) y dos genes de protectinas (*magA* y *rmpA*) y se encontró en un paciente con infección respiratoria (n=1). El patrón no. 4 conformado por tres genes de adhesión (*fimH*, *kpn*, *mrkD*) y de un gen de protectinas (*ycfM*) se identificó en un paciente con bacteremia (n=1).

Tabla 7. Patrones de genes de virulencia de acuerdo con el origen de las diferentes cepas.

No.	Patrón	Origen				Porcentaje n=5 No. (%)
		Infección en vías urinarias n=1 No. (%)	Infección cervico- vaginal n=1 No. (%)	Infección respiratoria n=2 No. (%)	Bacteremia n=1 No. (%)	
1	<i>fimH/ycfM/kpn/mrkD/rmpA/magA</i>	1 (100)	1 (100)	0	0	2 (40)
2	<i>fimH/ycfM/kpn/mrkD/rmpA</i>	0	0	1 (50)	0	1 (20)
3	<i>ycfM/kpn/mrkD/magA</i>	0	0	1 (50)	0	1 (20)
4	<i>fimH/ycfM/kpn/mrkD</i>	0	0	0	1 (100)	1 (20)

Detección de la expresión de los genes de virulencia de *K. pneumoniae*

La expresión de los genes en las cepas sembradas en medio soya tripticaseína (ST) e infusión cerebro-corazón (BHI) se observa en la tabla 8. Los genes de adhesinas *kpn* (Figura 17) y *mrkD* (Figura 18), así como el gen de la cápsula *ycfM* (Figura 19) se expresaron en el 100% (n=5) de las cepas en ambos medios de cultivo. Asimismo, *fimH-1* (Figura 16) se expresó en el 100% (n=5) de cepas en medio BHI,

mientras que las cepas en medio ST expresaron este mismo gen en un 60% (n=3). Por otro lado, *mpa* y *magA* relacionados con la hipermucoviscosidad, no se expresaron en ninguna de las cepas de *K. pneumoniae* en los distintos medios.

Tabla 8. Expresión de los genes de virulencia detectada por PCR en tiempo real en pacientes con diferentes diagnósticos.

Función	Gen	Infección respiratoria		Infecciones cervico-vaginales		Infecciones de vías urinarias		Bacteremia		Total	
		n= 2		n= 1		n= 1		n= 1		n= 5	
		No. (%)		No. (%)		No. (%)		No. (%)		No. (%)	
		ST	BHI	ST	BHI	ST	BHI	ST	BHI	ST	BHI
Adhesinas	<i>fimH-1</i>	2 (100)	2 (100)	0	1 (100)	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)	3 (60)	5 (100)
	<i>kpn</i>	2 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)	5 (100)
	<i>mrkD</i>	2 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)	5 (100)
Cápsula/ hipermuco- - viscosidad	<i>ycfM</i>	2 (100)	2 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	5 (100)	5 (100)
	<i>mpa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>magA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

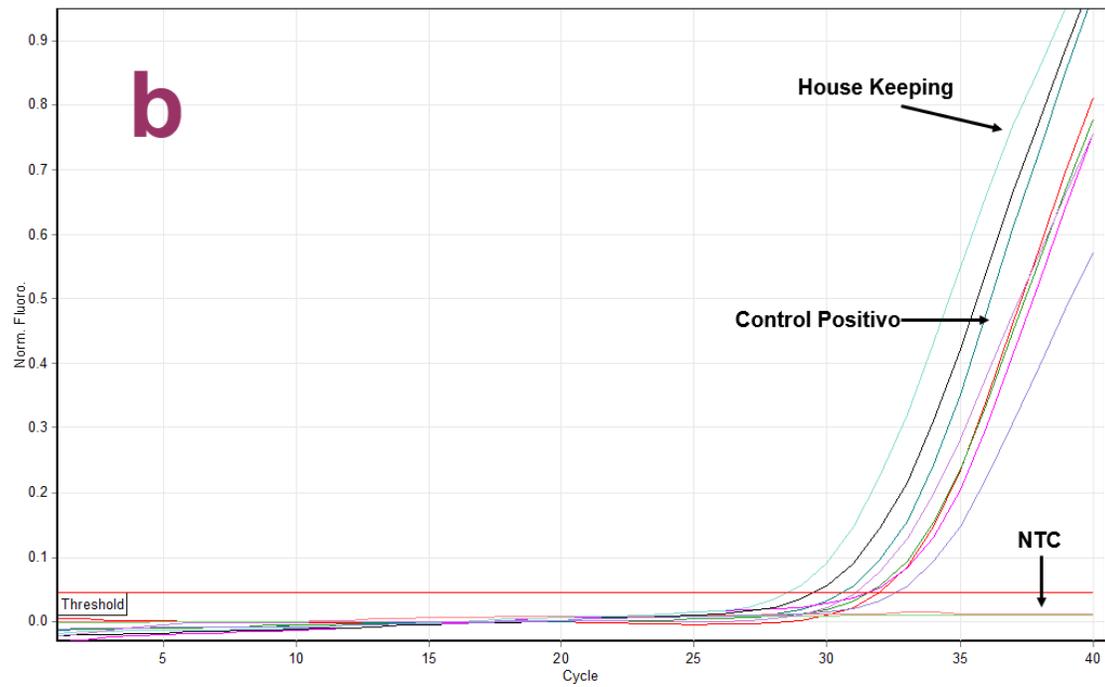
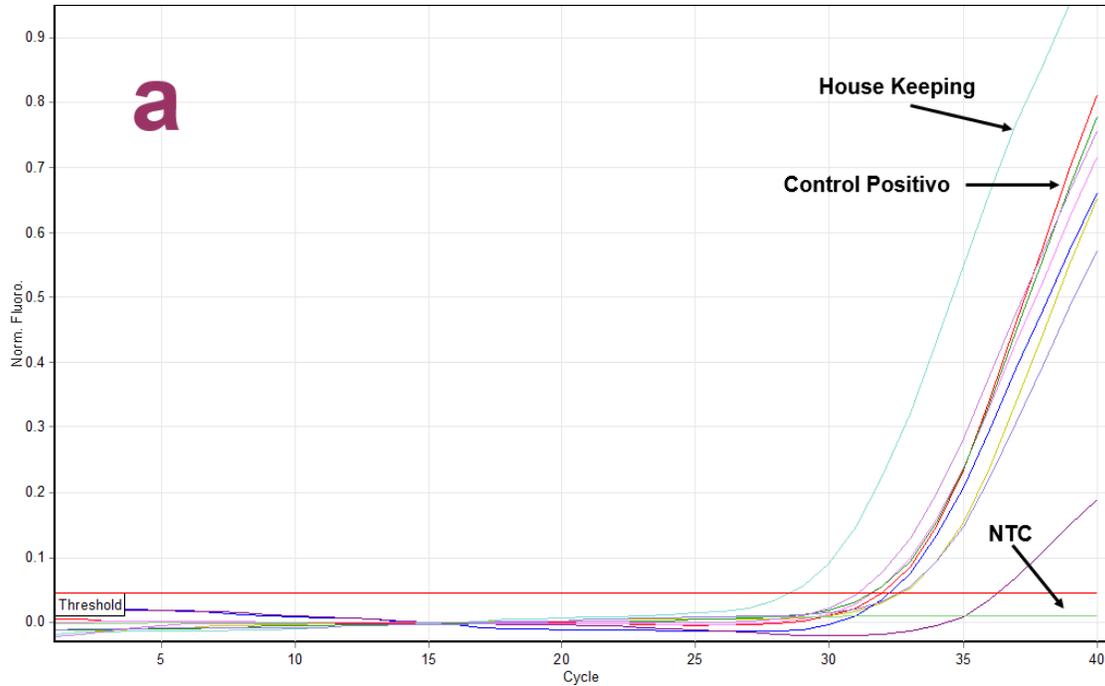


Figura 16. Detección de la expresión del gen *fimH-1* en cepas de *K. pneumoniae* por PCR en tiempo real, utilizando el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen). a) Cepas en medio soya tripticaseína (ST). b) Cepas en medio infusión cerebro- corazón (BHI). La corrida fue realizada en el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett), la lectura se realizó en el canal verde. House Keeping: Gen *rpoB* (Control interno). Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC 700721. NTC: Control sin DNA molde (Non control template).

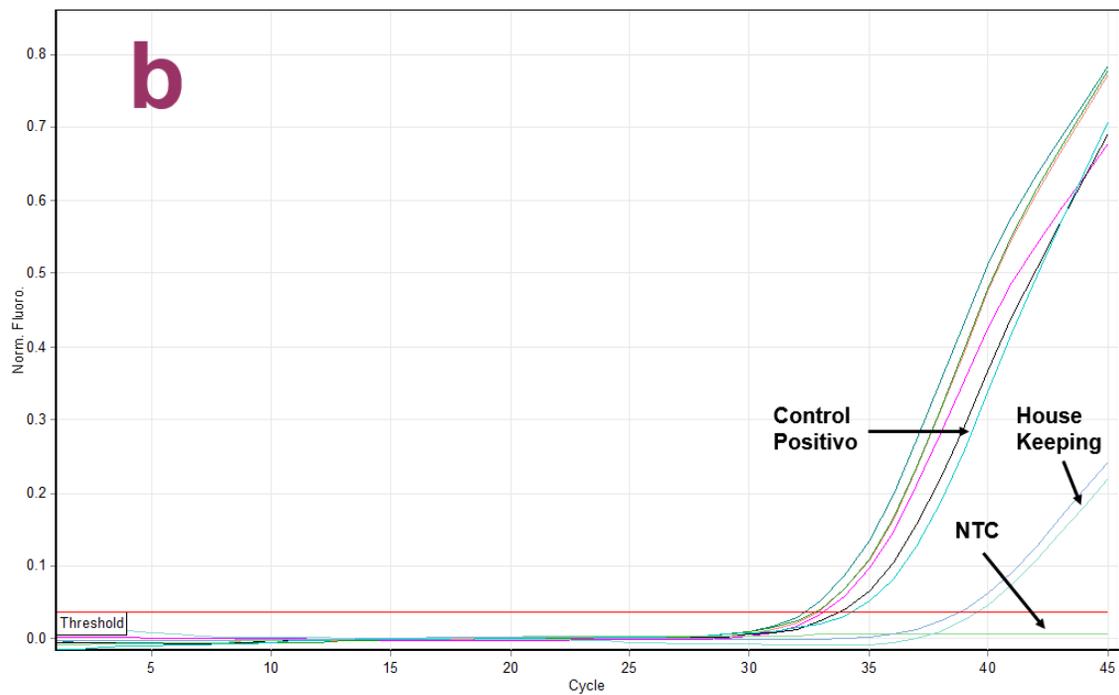
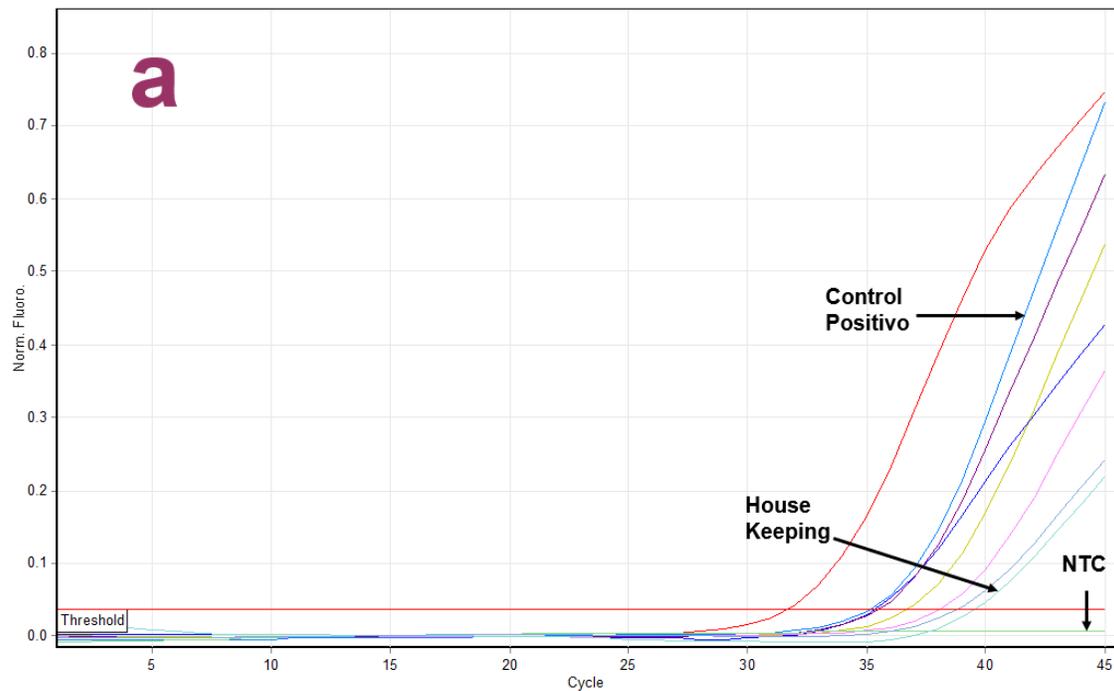


Figura 17. Detección de la expresión del gen *kpn* en cepas de *K. pneumoniae* por PCR en tiempo real, utilizando el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen). a) Cepas en medio soya tripticaseína (ST). b) Cepas en medio infusión cerebro- corazón (BHI). La corrida fue realizada en el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett), la lectura se realizó en el canal verde. House Keeping: Gen *rpoB* (Control interno). Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC 700721. NTC: Control sin DNA molde (Non control template).

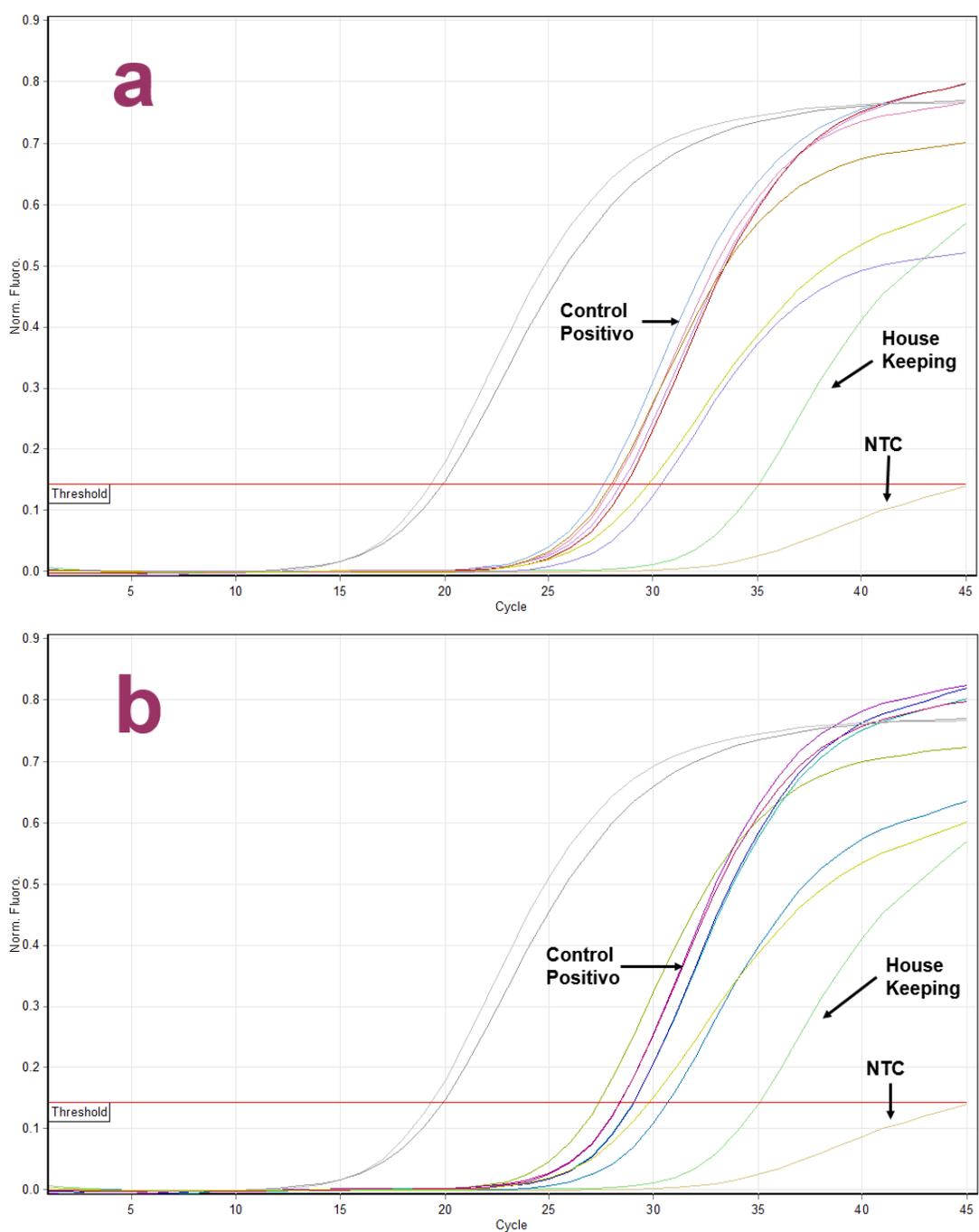


Figura 18. Detección de la expresión del gen *mrkD* en cepas de *K. pneumoniae* por PCR en tiempo real, utilizando el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen). a) Cepas en medio soya tripticaseína (ST). b) Cepas en medio infusión cerebro- corazón (BHI). La corrida fue realizada en el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett), la lectura se realizó en el canal verde. House Keeping: Gen *rpoB* (Control interno). Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC 700721. NTC: Control sin DNA molde (Non control template).

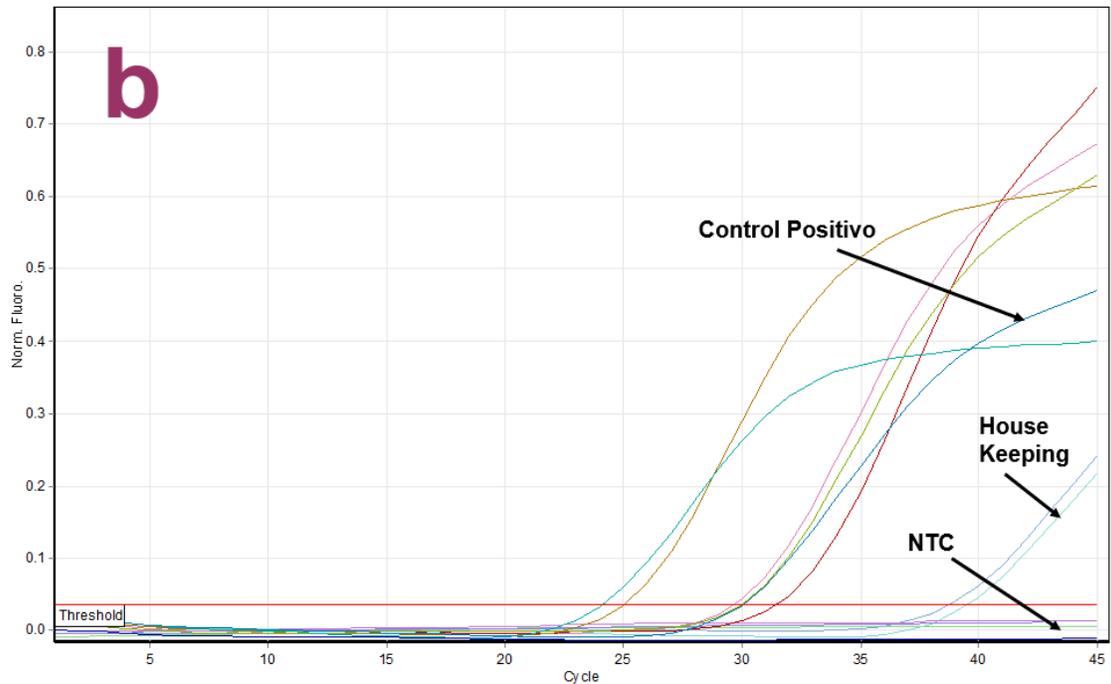
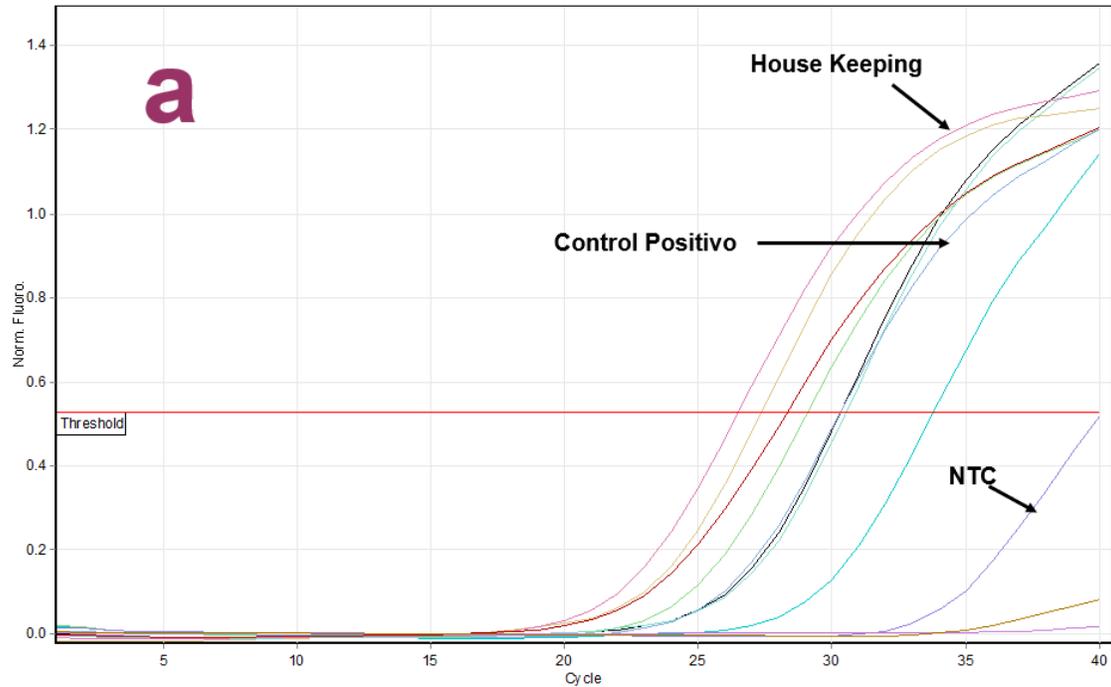


Figura 19. Detección de la expresión del gen *ycfM* en cepas de *K. pneumoniae* por PCR en tiempo real, utilizando el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen). a) Cepas en medio soya tripticaseína (ST). b) Cepas en medio infusión cerebro- corazón (BHI). La corrida fue realizada en el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett), la lectura se realizó en el canal verde. House Keeping: Gen *rpoB* (Control interno). Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC 700721. NTC: Control sin DNA molde (Non control template).

Análisis estadístico

El análisis estadístico a través de la prueba de χ^2 ($p < 0.05$) arrojó que estadísticamente no existen diferencias significativas en la expresión de los genes de adhesinas y protectinas en las cepas crecidas en los dos medios de cultivo: caldo infusión cerebro corazón (BHI) y soya tripticaseína (ST).

DISCUSIÓN

Pacientes analizados

En este estudio se encontró que el 80% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* analizadas provinieron de mujeres y el 20% de hombres (Figura 7). La elevada frecuencia de infecciones en mujeres en este estudio coincide con lo descrito en un estudio realizado en cepas hospitalarias de *K. pneumoniae* (n=40), donde el 55% correspondió a mujeres y el 45% a hombres (Dehghan *et al.*, 2017). En otro estudio realizado por Ikeda *et al.* (2016) del total de cepas analizadas (n=68), el 72% fueron de hombres y sólo el 28% de mujeres.

La edad de los pacientes estudiados se encontró en el rango de 29 hasta los 60 años, siendo más abundante el grupo de pacientes entre los 51 a 60 años con el 60% (Figura 8). Este porcentaje coincide con lo descrito por Cubero *et al.* (2015), en el cual analizaron un grupo de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con distintas edades, principalmente de personas mayores a los 53 años representando el 62%, mientras que, en otro estudio llevado a cabo en cepas de bacterias causantes de infecciones vaginales, entre las cuales obtuvieron muestras de *Klebsiella pneumoniae* de pacientes mayores a 50 años (Acevedo y Castillo, 2019)

Identificación de *Klebsiella pneumoniae* en cepas de distinto origen

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista que ocasiona infecciones respiratorias de las vías altas y también de las vías bajas, como neumonía. La neumonía es una infección causada por *K. pneumoniae* que puede ser adquirida en la comunidad o en los hospitales. Aproximadamente el 12% de las infecciones respiratorias nosocomiales en el mundo son provocadas por *K. pneumoniae* (Deniz y Aksöz, 2015; Ashurst y Dawson, 2018).

En este estudio se analizaron dos cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con infecciones respiratorias con edades comprendidas en el intervalo de 50-60

años, que coincide con un estudio realizado recientemente en cepas de *K. pneumoniae* (n=34) aisladas de pacientes (51 a 60 años) con neumonía (Expósito *et al.*, 2018). De igual forma, Ikeda *et al.* (2016), tomaron 68 muestras de esputo en pacientes con infecciones respiratorias, de las cuales 21 fueron identificadas como neumonía causada por *Klebsiella pneumoniae*.

La población microbiana del tracto cervico-vaginal es muy heterogénea ya que está compuesta de una gran diversidad de especies bacterianas. A pesar de que *K. pneumoniae* se ha encontrado como parte de la microbiota vaginal en mujeres sanas (Muñoz, 2019), también está asociada a infecciones cervico-vaginales, la mayoría de las cuales son obtenidas a través de las heces debido a la cercanía con la cavidad vaginal. Como se observa en la Tabla 6, se analizó una cepa de una paciente que presentó infección cervico-vaginal provocada por *K. pneumoniae*, esto coincide con Calle (2017) que reportó que, de 168 muestras procesadas obtenidas de exudados vaginales, aunque la mayoría de ellas presentaron un cultivo perteneciente a la especie *Escherichia coli* (37.9%), también en el 19.5% se encontró *Klebsiella pneumoniae*. De acuerdo con Siu-Au *et al.* (2011), *Klebsiella pneumoniae* ha sido encontrada en muestras de secreciones vaginales a causa de una infección, sin embargo, no es la especie bacteriana más frecuente.

Se ha estudiado que *Klebsiella pneumoniae* se encuentra íntimamente relacionada con el desarrollo de infecciones en vías urinarias (IVUs) siendo de los microorganismos más frecuentemente aislados de este padecimiento junto con *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.* y *Proteus spp.* (Acevedo y Castillo, 2019). Este tipo de infecciones es común tanto en hombres como en mujeres (Golebiewska, *et al.*, 2019), sin embargo, debido a que en la próstata se pueden identificar ciertos procesos infecciosos urinarios, la prevalencia de IVUs aumenta en varones en medida que existe una obstrucción por patología prostática o simplemente con el paso de los años (Andreu, *et al.*, 2011). En este estudio se obtuvo una cepa de un paciente varón con infección en vías urinarias (100%), que al igual que lo reportado por Velázquez y colaboradores en

2017 fue causada por la bacteria *K. pneumoniae*, teniendo mayor prevalencia en hombres (19%) que en mujeres (14%).

Diversas especies del género *Klebsiella* son patógenos asociados a la bacteremia, sobre todo en niños menores de 5 años provenientes de África, siendo una de las principales causas de muerte según estudios post-mortem (Massinga *et al.*, 2021). De acuerdo con la Tabla 6, en este trabajo, una cepa fue aislada de un paciente con bacteremia que coincide con un estudio realizado en 2019 por Balkhair *et al.* en adultos mayores a 18 años con bacteremia de los cuales se aislaron cepas no sólo de *Klebsiella pneumoniae*, sino también de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Asimismo, en un estudio fueron aisladas cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* en pacientes adultos hospitalizados con bacteremia (Lespada *et al.*, 2019).

Presencia de genes de virulencia

El fenotipo hipermucoviscoso de *Klebsiella pneumoniae* está asociado principalmente a dos factores de virulencia: *rmpA* (regulator of mucoid phenotype A) (Figura 14) y *magA* (mucoviscosity associated gene A) (Figura 15), en este trabajo se detectó ambos genes en la cepa obtenida de infección en vías urinarias (Tabla 6), contrastado con lo reportado por Golebiewska y cols (2019) que observaron que el gen *rmpA* fue encontrado sólo en el 6.6% de las cepas aisladas con las que trabajaron aisladas de pacientes con IVUs y que el gen *magA* que codifica para un polisacárido capsular no fue detectado en ninguna cepa. En cambio, Massinga *et al.* (2021) reportaron la presencia de los genes *rmpA* (9%) y *magA* (8%) en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes con bacteremia, en contraste, en el presente estudio la cepa del paciente con bacteremia no se detectó con los factores de virulencia *rmpA* y *magA* (Tabla 6).

En un estudio realizado en 2016 arrojó que el gen *mrkD* (Figura 12) fue el que más prevaleció en las cepas aisladas (Ranjbar *et al.*, 2016). Esto coincide con lo obtenido en este trabajo, ya que este gen que codifica para la fimbria tipo 3, también se detectó en el 100% de las cepas indistintamente del diagnóstico de los pacientes

(Figura 11), mientras que en el estudio de Ikeda *et al.* (2019) se reportó la presencia de *mrkD* en el 81% de las cepas de neumonía (n=21) y en el 95% de cepas de IVUs (n=28).

De igual forma, el gen *fimH* (Figura 10) que codifica para la fimbria tipo 1 (Tabla 1) fue identificado en el 100% de las cepas, sin embargo, se expresó únicamente en las cepas que fueron crecidas en medio BHI, ya que en las cepas crecidas en el caldo de Soya Trypticaseína no se expresó en las muestras obtenidas de infección en vías urinarias ni de infección cervico-vaginal (Tabla 8). Caneiras y colaboradores en su trabajo de 2019 reportaron resultados similares, pues detectaron a los genes de adhesinas *fimH* (96%) y *mrkD* (90%) como los más frecuentes en las cepas estudiadas que fueron inoculadas en medio BHI.

A pesar de que *kpn* (Figura 11) codifica también para fimbria tipo 1, fue reportado por El Fertas-Aissani *et al.* (2013) sólo en el 63% de las cepas estudiadas que aisló de orina, sangre, secreción pulmonar y líquido ascítico, en contraste, en este trabajo, *kpn* fue detectado en todas las cepas (Tabla 6). Del mismo modo, se encontró *kpn* como gen predominante en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de IVUs (75%) (Golebiewska *et al.*, 2019).

Los genes asociados a la cápsula, como *ycfM* (Figura 13) que codifica para una lipoproteína de membrana externa, promueven la infección de *Klebsiella pneumoniae* mediante la resistencia a fagocitosis (Deniz y Aksöz, 2015). Este gen fue encontrado en el 100% de las cepas analizadas (Tabla 6) sin importar de donde fueron aisladas, lo cual coincide con lo reportado por Massinga *et al.* (2021) que observó la presencia de *ycfM* en 43% de las cepas obtenidas de pacientes con bacteremia. De igual forma, el gen codificante para lipoproteína de membrana externa ha sido encontrado en cepas de *K. pneumoniae* provenientes de IVUs (70%) (Golebiewska *et al.*, 2019).

Expresión de genes de virulencia

En este trabajo se observó la expresión de *fimH* (Figura 16) y *kpn* (Figura 17), que codifica para adhesina similar a *fimH*, en todas las cepas aisladas (Tabla 8). En *Klebsiella pneumoniae* el gen que codifica para la fimbria tipo 1 (*fimH*) corresponde a un operón homólogo al de *Escherichia coli*. La expresión del operón *fim*, al igual que en *E. coli*, es controlada por un elemento promotor invertible y se ha visto expresada en ratas con IVUs (Rosen *et al.*, 2008).

Asimismo, Willsey *et al.* (2018) mediante RT-PCR estudió la expresión de genes *mrk* (ABC) que codifican para la fimbria tipo 3 en cepas de *K. pneumoniae* de infecciones en vías respiratorias, siendo *mrkA* el factor de virulencia más prevalente, estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo, ya que en el 100% de las cepas estudiadas fue expresado el gen *mrkD* (Figura 18).

El fenotipo hipermucoviscoso de *Klebsiella pneumoniae* se relaciona con la adquisición de plásmidos que contienen el gen A de hipermucoviscosidad (*magA*), característico del operón capsular K1, y del gen regulador del fenotipo mucoide (*rmpA*). Estos factores de virulencia son mediados por la cápsula y LPS, lo cual favorece la capacidad de la bacteria para producir biopelículas (Yinec *et al.*, 2020; Cubero *et al.*, 2016). Las biopelículas son comunidades de microorganismos en una matriz producida por ellos mismos, lo cual favorece su adhesión a superficies (Ortega-Peña y Hernández-Zamora, 2018).

Las cepas de *K. pneumoniae* fueron inoculadas en caldo soya tripticaseína (ST) y caldo infusión cerebro- corazón (BHI) por lo cual, no existía como tal una superficie a la cual pudieran adherirse en forma de biopelícula, debido a esto podemos inferir que, bajo estas condiciones, no fue necesaria la expresión de estos genes relacionados con la hipermucoviscosidad de la bacteria, sin embargo, para poder afirmarlo, se requiere experimentación adicional.

Es posible que la expresión de estos marcadores de virulencia ocurra durante los procesos infecciosos de los pacientes, por lo que sería interesante establecer la expresión de estos genes utilizando modelos in vitro de infección en líneas celulares

humanas, que se asemejen más al epitelio del hospedero donde normalmente se desarrolla *K. pneumoniae*.

Hasta el momento no existen muchos estudios de investigación relacionados con la expresión de factores de virulencia en *Klebsiella pneumoniae*, por lo que resulta importante abrir nuevas líneas de investigación sobre ello.

CONCLUSIONES

- La mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* analizadas provinieron de mujeres mayores de 51 años.
- Las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas ocasionaron infecciones respiratorias, infecciones vaginales, así como infecciones de las vías urinarias y bacteremia.
- Los genes de virulencia *fimH-1*, *kpn*, *mrkD* y *ycfM* involucrados en la adhesión y formación de biopelícula fueron encontrados en todas las cepas siendo indistinto el diagnóstico de los pacientes.
- Los genes *rmpA* y *magA* asociados a la hiper mucoviscosidad no fueron detectados en la cepa asociada a bacteremia.
- El patrón de genes más frecuente en las cepas fue aquel que incluía los seis genes estudiados y se encontró en común en la cepa de infección en vías urinarias e infección cervico-vaginal.
- La expresión de genes *kpn*, *mrkD* y *ycfM* fue observada en todas las cepas independientemente del medio de cultivo utilizado o el diagnóstico de los pacientes.
- No se detectó la misma frecuencia de expresión del gen *fimH-1* en el medio ST que en el medio BHI, sin embargo, el análisis estadístico sugiere que no existen diferencias significativas entre ambos medios.
- Aquellos genes asociados a la hiper mucoviscosidad no se expresaron en ninguna de las cepas de los pacientes con diferentes infecciones, por lo cual es conveniente futuros estudios descartando ciertas variables.
- La elevada expresión de los genes de virulencia demostró la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones graves en los pacientes hospitalizados.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, V., Castillo, E. (2019). Prevalencia y resistencia microbiana en las infecciones urinarias de la mujer en el climaterio. *Archivos de Ginecología y Obstetricia*. 57(2): 119-130.
- Alvo, A., Téllez, V., Sedano, C., Fica, A. (2016). Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. 76:136-147.
- Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., Lepe, J. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades e Infecciones de Microbiología clínica*. 29:52-57.
- Ashurst, J., Dawson, A. (2018). *Klebsiella pneumoniae*. StatPearls. Treasure Island.
- Bakás L, Maté, S., Vazquez, R., Herlax, V. (2013). Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. *Bioquímica Clínica*. 47(2):353-361.
- Balkhair, A., Muharri, Z., Al'Adawi, B., Busaidi, A., Taher, H., Al'Siyabi, T., Al Amin, M., Hassan, K. (2019). Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: Description of a decade-long trend. *International Journal of Infectious Diseases*. 85: 10-25.
- Bengoechea, J., Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defenses. *FEMS Microbiology Reviews*. 43: 123-144.
- Brooks, G., Carroll, K.C., Butel, J., Morse, S., Jawetz, M., Adelbergs. (2017). *Medical Microbiology*. 27° edición. McGraw Hill Professional. Pp. 231–244.
- Calderón, G., Aguilar, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 73(621): 757-763.

- Calle, B. (2017). Agentes patógenos en secreción vaginal de las trabajadoras sexuales que acuden al centro de salud Pumapungo, Cuenca, 2016. *Universidad de Cuenca*.
- Caneiras, C., Lito, L., Mayoralas-Alises, S., Días-Lobato, S., Melo-Cristino, J., Duarte, A. (2019). Virulence and resistance determinants of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Portuguese tertiary university hospital centre over a 31-year period. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 37(6): 387-393.
- Catalán-Najera, J., Barrios-Camacho, H., Duran-Bedolla, J., Sagal-Prado, A., Hernández-Castro, R., García-Méndez, J., Morfín-Otero, R., Velázquez-Larios, M., Ortiz-Navarrete, V., Gutierrez-Xicotencatl, L., Alpuche-Aranda, C., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U. (2019). Molecular characterization and pathogenicity determination of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates serotype K2 in Mexico. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 94: 316-319.
- Cheng, F., Li, Z., Lan, S., Liu, W., Li, X., Zhou, Z., Song, Z., Wu, J., Zhang, M., Shan, W. (2018). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* associated with cattle infections in southwest China using multi-locus sequence typing (MLST), antibiotic resistance and virulence-associated gene profile analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 495: 93-100.
- Chittò, M., Berger, M., Klotz, L., Dobrindt, U. (2020). Sub-Inhibitory concentrations of SOS-Response inducing antibiotics stimulate integrase expression and excision of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *International Journal of Medical Microbiology*. 310(1): 151361
- Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C. (2014). Other pathogenic Enterobacteriaceae – *Enterobacter* and other genera. *Encyclopedia of Food Safety*. 1: 433-441.
- Cubero, M. (2015). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina. Universitat de Barcelona. Barcelona, España.

- Cubero, M., Grau, I., Tubau, F., Pallarés, R., Domínguez, M., Liñares, J., Ardanuy, C. (2015). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). *Clinical Microbiology and Infection*. 22: 154-160.
- Cubero, M., Marti, S., Domínguez, M., González-Díaz, A., Barbel, D., Ardanuy, C. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 clinical isolates form robust biofilms at the air-liquid interface. *Plos ONE*. 14(9): e0222628.
- Dehghan, F., Zolghadri, N., Karmostaji, A. (2017). Genetic Determinants of antibiotic resistance in hospital and community isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 10(5): e45678.
- Dehshiri, M., Khoramrooz, S., Zoladi, M., Khosravani, A., Parhizgari, N., Hosseini, M., Jahedi, S., Sharifi, A. (2018). The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials*. 17:4.
- Deniz, E., Aksöz, N. (2015). *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochimica Polonica*. 62(4): 867-874.
- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*. 61: 209-216.
- Ferreira, R., da Silva, B., Rezende, G., Nakamura-Silva, R., Pitondo-Silva, A., Boni, E., Brito, M., da Silva, E., de Melo, C., da Cunha, A., da Silva, M.C. (2019). High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring Several Virulence and betalactamase encoding genes in a Brazilian Intensive Care Unit. *Frontiers in Microbiology*. 9(3198).
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E., Tinoco, P., Pina-Gonzales, M., Barrios, H., Martínez-Barnetche, J., Gómez-Barreto, R., Tellez-

- Sosa, J. (2015). Development of a multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiology*. 15(64)
- Gołębiewska, J., Krawczyk, B., Wysocka, M., Ewiak, A., Komarnicka, J., Bronk, M., Rutkowski, B., Dębska-Ślizień A. (2019). Host and pathogen factors in *Klebsiella pneumoniae* upper urinary tract infections in renal transplant patients. *Journal of Medical Microbiology*. 68: 382-394.
 - González, J., Maguiña, C., González, F. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peruana*. 36(2):145-151.
 - Guzmán, M., Salinas, J., Toche, P., Afanis, A. (2004). Alergia a β -lactámicos. *Revista Chilena de Infectología*. 21(4): 285-298.
 - Ikeda, M., Mizoguchi, M., Oshida, Y., Tatsuno, K., Saito, R., Okazaki, M., Okugawa, S., Moriya, K. (2018). Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *Klebsiella pneumoniae* infection in Japan. *International Journal of General Medicine*. 11: 293-299.
 - Jeong, Y., Kim, S., Ree, Y., Heon, S., Kyung, H., Young, S., Joon, Y. (2017). Virulence factors and clinical patterns of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine. *Infectious Diseases*. 49(3):178-184.
 - Lespada, M., Cordova, E., Roca, V., Gómez, N., Badía, M., Rodríguez, C. (2019). Bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC. Estudio comparativo y evolución en 7 años. *Sociedad Española de Quimioterapia*. 32(1):15-21.
 - Li, J., Ji, X., Deng, X., Zhou, Y., Ni, X., Liu, X. (2015). Detection of the SHV genotype polymorphism of the extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacterium. *Biomedical Reports*. 3: 261-265.
 - Liakopoulos, A., Mevius, D., Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*. 7:1374.
 - Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D. (2015). Brock. Biología de los microorganismos. 14° ed. PEARSON.

- Maldonado, N., Silva, C., Cecilia, M., Nader-Macias, M. (2007). A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 52-59.
- Martin, R., Bachman, M. (2017). Colonization, infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8(4).
- Miranda-Navales, M., Flores-Moreno, K., López-Vidal, Y., Rodríguez-Alvarez, M., Solórzano-Santos, F., Soto-Hernández, J., de León-Rosales, S. (2020). Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *Salud Pública de Mexico*. 62(1): 42-49.
- Moreno, X., Armas, A., Panizo, M., Garcés, M. (2020). Formación de biopelículas por *Klebsiella pneumoniae* aislada en heces de pacientes con Trastorno del Espectro Autista. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 40:12-18.
- Munkhdelger, Y., Gunregjav, N., Dorjpurev, A., Juniichiro, N., Sarantuya, J. (2017). Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *Journal of Infectiology Dev Ctries*. 11(1):51-57.
- Muñoz, P. (2019). Actualización Clínica y Diagnóstica de vaginosis bacteriana y vulvovaginitis. *Universidad de Talca*. Talca-Chile.
- Naomi-Matzuoka, A., Vargas, M., Ymaña, B., Soza, G., Pons, M. (2020). Resistencia a la colistina en cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogoresistente del periodo 2015-2018 en un instituto materno perinatal de Lima, Perú. *Revista Peru Med Exp Salud Pública*. 37(4): 716-720.
- Ortega-Peña, S., Hernández-Zamora, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 75(2): 79-88.
- Paczosa, M., Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense

with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80: 629-661.

- Podschun, R., Ullman, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(4): 589-603.
- Radi, J., Nadhim, J. (2018). Hemolysin gene detection in some isolates of *Klebsiella pneumoniae* by PCR. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*. 17(2):49-52.
- Ranjbar, R., Memariani, H., Sorouri, R., Memariani, M. (2016). Distribution of virulence genes and genotyping of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI). *Microbial Pathogenesis*. 100: 244-249.
- Remya, P.A., Shanthi, M., Sekar, U. (2019). Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 37(2):210-218.
- Rosen, D., Pinkner, J., Jones, J., Walker, J., Clegg, S., Hultgren, S. (2008). Utilization of an Intracellular Bacterial Community Pathway in *Klebsiella pneumoniae* Urinary Tract Infection and the Effects of FimK on Type 1 Pilus Expression. *Infection and Immunity*. 76(7): 3337-3345.
- Russo, T.A., Marr, C.M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology*. 32:e00001-19.
- Salazar-Holguin, H., Cisneros-Robledo, M. (2016). Resistencia a los antimicrobianos de agentes causales de las principales infecciones nosocomiales. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 54(4): 462-471.
- Siu-Au, A., Calderón-Ticona, J., Guillén-Oneeglio, A., Silva-Olivera, A. (2011). Flora microbiana en las infecciones vaginales y comparación del tratamiento entre dos combinaciones de fármacos. *Revista Soc Peru Med Interna*. 4(1): 5-11.
- Spurbeck, R.R. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* en Spurbeck y Mobley

(eds.), *Eschechichia coli*. Pathotypes and Principles of Pathogenesis. (2° ed.). Academic Press.

- Suárez, C., Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(2): 116-129.
- Theuretzbacher, U., Carrara, E., Conti, M., Tacconelli, E. (2021). Role of new antibiotics for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 76(1): 47-54.
- Vargas, J.M., Moreno, M.P., Nuñez, J.M., Cáceres, M., Mochi, S., del Campo, R., Jure, M.A. (2019). Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon*. 5: e01829.
- Velázquez, G., Lird, G., Melgarejo, L., Walder, A., Chírigo, C., Santa Cruz, F. (2017). Resultados de urocultivos en adultos realizados por el laboratorio de microbiología del Hospital de Clínicas - San Lorenzo de enero del 2015 a agosto de 2016 y métodos de estudio de las infecciones urinarias disponibles en la institución. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas*. 50(2): 51-65.
- Visvikis, O., Boyer, L., Torrino, S., Doye, A., Lemonnier, M., Lorès, P. (2011). *Escherichia coli* producing CNF1 toxin hijacks Tollip to trigger Rac1-dependent cell invasion. *Traffic*. 12(5):579-590.
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M.P., Libori, M., Tiracchia, V., Salvia, A., Varaldo, P. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*. 123:1003-1018.
- Willsey, G., Ventrone, S., Schutz, K., Wallace, A., Ribis, J., Suratt, B., Wargo, M. (2018). Pulmonary surfactant promotes virulence gene expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 86(7).
- Yu, W., Wen-Chien, K., Kuo-Chen, C., Hsin-Chun, L., Der-Shin, K., Ching-Chien, L., Chang-Phone, F., Yin-Ching, C. (2006). Association between *rmpA* y *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases*. 42: 1351- 1358
- Yinec, Y., Labrador, I., Araque, M. (2020). Fenotipo hipermucoviscoso de

Klebsiella pneumoniae hipervirulenta: Lo nuevo de un viejo enemigo.
Avances en Biomedicina. 8(1): 21-29.

- Zamani, A., Yousefi, R., Morteza, A., Yousef, M. (2013). Detection of *magA* Gene in *Klebsiella spp.* Isolated from Clinical Samples. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 16:173-176.