



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

TITULO

UN PLÁSMIDO DE *Klebsiella variicola* CONFIERE UN FENOTIPO SIMILAR A LA HIPERMUCOVISCOSIDAD QUE ALTERA LA PRODUCCIÓN DE LA CÁPSULA Y AUMENTA LA VIRULENCIA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
NADIA NAYELI RODRIGUEZ MEDINA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESUS ULISES GARZA RAMOS MARTINEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

COMITE TUTOR:
DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO-CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS
DR. JESUS MARTINEZ BARNETCHE -INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CUERNAVACA, MOR. MEX; JULIO 2021



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.

A mi familia
A Ulises
Por su apoyo y amor incondicional

INDICE

1. RESUMEN.....	5
2. MARCO TEORICO	6
2.1. Complejo <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> : una bacteria comensal y patógena	7
2.3. El resistoma de <i>K. pneumoniae</i>	8
2.3.1. Diversidad de plásmidos en <i>K. pneumoniae</i>	11
2.4. Variantes de <i>K. pneumoniae</i> : clásica, hipervirulenta e hipermucoviscosa.....	13
2.5. Factores de virulencia.....	18
2.5.1. Cápsula.....	20
2.5.2. Organización de la cápsula.....	25
2.5.3. Regulación de la producción de la cápsula.....	26
2.5.4. La hipermucoviscosidad: un fenotipo asociado a la cápsula.....	29
2.5.4.1. Reguladores del fenotipo hipermucoviscoso.....	30
2.6. Plásmidos de virulencia y elementos integrativos conjugativos (ICE).....	35
2.7. Genómica poblacional de <i>K. pneumoniae</i>	38
2.7.1 Características de los grupos clonales representativos de <i>K. pneumoniae</i>	40
2.8. <i>Klebsiella variicola</i>	40
2.8.1 Epidemiología de <i>K. variicola</i>	41
2.8.2. <i>K. variicola</i> como un patógeno emergente en humanos.....	43
2.8.3. Patogenicidad de <i>K. variicola</i>	45
2.8.3. El resistoma de <i>K. variicola</i>	48
2.8.4. Genómica poblacional de <i>K. variicola</i>	51
2.8.5. Distribución ambiental de <i>K. variicola</i>	53
2.8.6. Fenotipos de <i>K. variicola</i> : clásica, hipervirulenta e hipermucoviscosa.....	56
2.8.6.1 <i>K. variicola</i> clásica.....	56
2.8.6.2 <i>K. variicola</i> hipervirulenta.....	59
2.8.6.3 <i>K. variicola</i> hipermucoviscosa.....	60
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	60
4. OBJETIVO GENERAL.....	60
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	60
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
5.1 Identificación de aislamientos bacterianos.....	61
5.2 Ensayos de conjugación, inducción <i>in vitro</i> de mutantes de <i>Klebsiella variicola</i> resistentes al ácido nalidíxico y estabilidad del plásmido.....	61
5.3 Extracción de plásmidos mediante lisis alcalina.....	64
5.4 Curación de plásmidos.....	66
5.5 Ensayo de mucoviscosidad.....	67
5.6 Extracción y cuantificación de cápsula.....	67

5.7 Ensayo de resistencia a la fagocitosis.....	68
5.8 Ensayo de resistencia a suero humano.....	68
5.9 Modelo de infección de ratón y curvas de supervivencia.....	69
6. Secuenciación del genoma completo de <i>Klebsiella variicola</i> 8917.....	70
6.1 Análisis comparativo de genoma y plásmido.....	70
6. RESULTADOS.....	72
7. DISCUSIÓN.....	87
8. CONCLUSIÓN.....	94
9. REFERENCIAS.....	95

1. RESUMEN

La hipermucoviscosidad (hmv) es un fenotipo asociado a la cápsula generalmente vinculado con cepas hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae*. Los componentes clave de este fenotipo son los genes *rmpADC* y *rmpA2* contenidos en plásmidos no transmisibles identificados y estudiados en *K. pneumoniae*. *Klebsiella variicola* está estrechamente relacionada con *K. pneumoniae* y recientemente se ha identificado como un patógeno humano emergente. *K. variicola* normalmente contiene plásmidos, algunos de los cuales portan genes de virulencia y resistencia a los antibióticos. Previamente, describimos un aislamiento clínico de *K. variicola* que muestra el fenotipo hmv y que alberga un plásmido denominado pKV8917 de 343-kb. En el presente estudio, investigamos si el plásmido pKV8917 de *K. variicola* 8917 está vinculado con el fenotipo hmv y su contribución a la virulencia. Encontramos que al curar el plásmido pKV8917 de 343-kb se produjo la pérdida de la hmv, una reducción de casi el 50% de la producción de la cápsula ($P < 0.001$) y la virulencia. Además, el plásmido pKV8917 puede transferirse a cepas de *E. coli* y *K. variicola* mediante conjugación. En particular, cuando el plásmido pKV8917 se transfiere a *K. variicola*, los transconjugantes mostraron un incremento en la virulencia, la presencia del fenotipo hmv y un aumento en la producción de cápsula de $18 \mu\text{g}/10^9$ a $79 \mu\text{g}/10^9$ UFC de ácido glucurónico. En contraste, estos fenotipos no se observaron en las transconjugantes de *E. coli*. Estos datos sugieren que el plásmido pKV8917 porta genes involucrados en la hmv y en la elevada producción de la cápsula. El análisis de la secuencia completa del plásmido pKV8917 reveló que carece de los genes *rmpADC* / *rmpA2*; por tanto, la hmv en *K. variicola* depende de otro mecanismo alternativo. El plásmido de 343-kb contiene un esqueleto de tipo IncFIB y comparte una región de ~150-kb con una identidad del 99% y una cobertura del 49% con los plásmidos p15WZ-82_Vir y pKSB1_10J (un plásmido de virulencia de *K. variicola* hipervirulenta y un plásmido de *K. pneumoniae* resistente a múltiples antibióticos, respectivamente). La región única de pKV8917 alberga un grupo de genes relacionados con la biosíntesis de celulosa (*bcs*), sistemas de fosfotransferasas específicos de fructosa y sacarosa (*fru/scr*), y los reguladores transcripcionales *araC* e *iclR*, los cuales están involucrados en la permeabilidad de la membrana. La presencia de aislamientos clínicos de *Klebsiella* con el fenotipo hmv sin los genes *rmpADC/rmpA2* apoya la existencia de vías alternas que confieren la hipermucoviscosidad en este género bacteriano.

2. MARCO TEORICO

2.1. Complejo *Klebsiella pneumoniae*

Las especies de *Klebsiella* son bacilos Gram-negativos, capsulados, no móviles, ureasa positivo e indol negativo y crecen en condiciones aeróbicas en un amplio rango de temperatura (30° a 40°) (1). El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y comprende especies que habitan en una variedad de nichos ecológicos tales como suelo, aguas residuales, animales, plantas, insectos y humanos (2). En todos estos nichos las especies de *Klebsiella* tienen diferentes comportamientos; puede ser colonizante, simbiote, promotora de crecimiento en plantas y patógena en animales y humanos (1).

El género *Klebsiella* es taxonómicamente diverso con varias especies reclasificadas en años recientes. Particularmente, el complejo *K. pneumoniae* (**Figura 1**) comprende las especies *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola* (a esta subespecie nos referiremos como *K. variicola*), *K. variicola* subsp. *tropica*, *K. africana* y finalmente *K. quasivariicola*, sin embargo; no se ha validado como una especie (3). Debido a la similitud de las características bioquímicas y fenotípicas, las especies del complejo *K. pneumoanie* no se pueden diferenciar por métodos microbiológicos tradicionales (3), por lo cual hoy en día se identifican mediante métodos moleculares, tales como: i) PCR o análisis filogenético del gen *rpoB*, ii) secuenciación del genoma completo o iii) el uso de MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight) (4). No obstante, los sistemas de PCR múltiple desarrollados hasta la fecha no diferencian las siete especies, solo permiten diferenciar correctamente a *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* de *K. pneumoniae* (5). Por otro lado, el uso de plataformas automatizadas tales como MALDI-TOF MS ha revolucionado la identificación rutinaria de bacterias patógenas debido a que es una técnica precisa, rápida y costo-efectiva (6). MALDI-TOF MS genera un espectro de masas que proporciona un perfil proteico único para cada microorganismo; el espectro de masas es comparado con la base de datos de referencia ya sea Bruker o bioMérieux para determinar la relación del perfil proteico con respecto a los espectros en la base de datos, de esta manera se identifica a que microorganismo corresponde (7). Las especies del complejo *K. pneumoniae* pueden ser diferenciadas correctamente mediante el

uso de esta plataforma; a pesar de ser especies relacionadas un estudio reciente identificó espectros únicos para cada una de las especies del complejo *K. pneumoniae* (8).

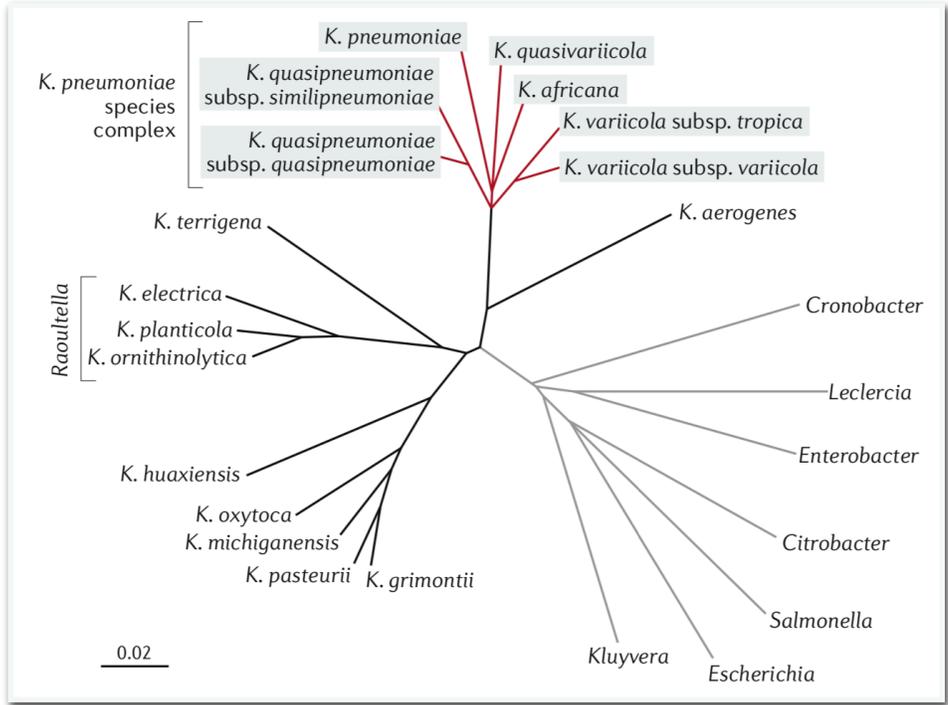


Figura 1. Posición taxonómica de las especies del complejo *K. pneumoniae* (3).

2.2. *Klebsiella pneumoniae*: una bacteria comensal y patógena

K. pneumoniae es una bacteria Gram-negativa causante de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) e infecciones adquiridas en la comunidad (IAC) (9). *K. pneumoniae* junto con otras bacterias patógenas del grupo ESKAPE (**E**nterococcus faecium, **S**taphylococcus aureus, **K**lebsiella pneumoniae, **A**cinetobacter baumannii, **P**seudomonas aeruginosa y **E**nterobacter) han sido la causa más frecuente de IAAS afectando a personas hospitalizadas o inmunocomprometidas. Las bacterias del grupo ESKAPE son consideradas una amenaza a la salud pública debido al surgimiento de cepas resistentes a la mayoría o a todos los antibióticos disponibles para el uso clínico (10). *K. pneumoniae* es la prioridad número 3 de la lista de patógenos sujetos a investigación y desarrollo de nuevos antibióticos¹. Las

infecciones asociadas con *K. pneumoniae* comúnmente son neumonías, bacteremias, infecciones de tracto urinario (UTIs), infecciones de tejidos blandos e infecciones invasivas en forma de abscesos hepáticos (2).

La interacción entre *K. pneumoniae* y el humano es compleja y variable, ya que *K. pneumoniae* puede jugar diferentes papeles ya sea como comensal, patógeno oportunista o patógeno (3). La colonización del tracto gastrointestinal (GI) y el tracto respiratorio, particularmente la orofaringe es común. Sin embargo, la prevalencia varía respecto a la ubicación geográfica, grupo de edad y contacto reciente con personal de salud. Estudios realizados en EE.UU. y Australia han estimado que la colonización intestinal tiene una prevalencia aproximada de 4–6% en la comunidad, pero de hasta ~25% entre las personas con exposición reciente a la atención médica (11).

Se ha propuesto que la colonización intestinal por *K. pneumoniae* es un factor de riesgo para desarrollar una infección fulminante de tipo IAAS. Aunado a esto, estudios de genómica comparativa han demostrado que las cepas de colonización intestinal son la fuente más común de infecciones por *K. pneumoniae* (11;12); además se ha identificado que una carga elevada de *K. pneumoniae* en muestras fecales se ha asociado con un mayor riesgo de bacteriemia causada por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (13). Sin embargo, la frecuencia de colonización del tracto GI y orofaringe depende de si una persona ha estado hospitalizada o si ha recibido un tratamiento prolongado con antibióticos (9).

2.3. El resistoma de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae representa uno de los patógenos más preocupantes debido a que no solo es un reservorio y donante de genes de resistencia sino también porque en esta especie bacteriana han emergido nuevos genes de resistencia. Por esta razón, se le ha considerado como “el canario en las minas de carbón” (expresión que se refiere a una persona o cosa que sirven de advertencia temprana de una crisis por venir, en este caso una crisis relacionada a la resistencia antimicrobiana) (14). *K. pneumoniae* es intrínsecamente resistente a ampicilina debido a la presencia cromosomal del gen *bla_{SHV}* que codifica una β -lactamasa de tipo A.

https://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/

Genes ortólogos de esta β -lactamasa se encuentran conservados entre el complejo *K. pneumoniae*, bla_{LEN} se encuentra en *K. variicola* y en *K. quasivariicola* y bla_{OKP} en *K. quasipneumoniae* y *K. africana* (14). La β -lactamasa cromosomal bla_{SHV} ha sido movilizada por la IS26 y diseminada a otras especies a través de plásmidos; sin embargo, las variantes móviles contienen promotores más fuertes que la β -lactamasa cromosomal y mutaciones puntuales que le dan actividad de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) confiriendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación (3).

Después de la introducción de las cefalosporinas de tercera generación para el uso clínico, las BLEEs comenzaron a identificarse y caracterizarse. En *K. pneumoniae* se han identificado variantes de BLEEs como SHV-2 (1985), variantes de TEM (1984) y de CMY (1989). No obstante, las β -lactamasas de la familia CTX-M está ampliamente dispersa y cuyas variantes han sido identificadas en *E. coli*, *K. pneumoniae* y en otras especies filogenéticamente distantes como *Kluyvera* sp. CTX-M está asociada con clonas pandémicas de *E. coli* principalmente aquellas que son ST131 y también en clonas de *K. pneumoniae*. CTX-M está presente en diversos plásmidos, lo que resulta en una amplia diseminación en bacterias comensales de humanos y animales (15).

El uso extensivo de carbapenémicos ha resultado en la evolución de los genes de las carbapenemasas codificadas en plásmidos. Estas enzimas pueden hidrolizar todos los antibióticos β -lactámicos incluyendo los carbapenémicos. La IMP-1 fue la primera carbapenemasa descrita en *K. pneumoniae*. Años más tarde surgió la carbapenemasa KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) descrita en un brote hospitalario, la secuencia tipo (ST) asociada a este brote fue la ST258. Sin duda, la bla_{KPC} se convirtió en la carbapenemasa más prevalente en *K. pneumoniae*. Se han descrito cepas portadoras de bla_{KPC} en todos los continentes, siendo bla_{KPC-2} y bla_{KPC-3} los genes más comunes, los cuales son altamente prevalentes en cepas involucradas en brotes hospitalarios en muchos países.

El principal mecanismo para la propagación de estos genes fue y sigue siendo la expansión clonal de *K. pneumoniae* ST258, que, desde su primer reporte en los Estados Unidos (16) se ha vuelto endémica en muchas partes del mundo. Actualmente la clona ST258 está

ampliamente dispersa entre especies de la familia *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*. El éxito de la clona ST258 reside en que además de la diseminación clonal, los genes *bla*_{KPC} residen en transposones tipo *Tn4401* que se insertan en plásmidos con varios tipos de replicones, lo que facilita la diseminación del gen a otras especies o géneros bacterianos (15).

La metalo-β-lactamasa NDM-1 se detectó por primera vez en un aislamiento de *K. pneumoniae* obtenido de un paciente que había viajado a la India. El gen *bla*_{NDM-1} se encuentra codificado en plásmidos y poco después se identificó en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con y sin antecedentes de viaje a la India. Hasta el momento la metalo-β-lactamasa NDM-1 se ha identificado en numerosos plásmidos y especies de Enterobacterias, y en algunos casos como *E. coli* y *Providencia stuartii* esta enzima se encuentra en su cromosoma. Finalmente, el primer mecanismo móvil de resistencia a colistina fue el gen *mcr-1* identificado en *E. coli* y *K. pneumoniae*, a partir de estas especies el gen *mcr-1* se encuentra ampliamente diseminado entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y también se ha identificado en numerosos plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad (14).

Con el uso cada vez mayor de carbapenémicos para tratar las infecciones por *K. pneumoniae* productoras de BLEEs, se produjeron numerosos procesos. (i) Surgió la resistencia a los carbapenémicos mediada por alteraciones de la permeabilidad de la membrana; (ii) la aparición de genes BLEE únicos con un espectro de actividad más amplio, como *bla*_{GES} (17;18); (iii) nuevos genes de carbapenemasas codificados por plásmidos como *bla*_{OXA-48} y *bla*_{VIM} llegaron a *K. pneumoniae*, ahora reportados como endémicos en diferentes países y (iv) la translocación de genes que codifican carbapenemasa, como *bla*_{VIM-1} y *bla*_{NDM-1}, de plásmidos al cromosoma de *K. pneumoniae* (18).

Las infecciones por *K. pneumoniae* son causadas por diversas clonas distribuidas globalmente, particularmente los grupos clónales (CG, clonal groups por sus siglas en inglés) CG258, CG15, CG20 (CG17), CG29, CG37, CG147, CG101 (CG43) y CG307 se asocian a clonas pandémicas MDR (3).

2.3.1. Diversidad de plásmidos en *K. pneumoniae*

Los plásmidos son vehículos importantes para la transferencia de genes de resistencia antimicrobiana (AMR), virulencia, metabolismo y genes accesorios. Además, estas moléculas de DNA extracromosomal codifican factores de inicio de la replicación independientemente de la replicación del cromosoma de la bacteria, para mantener un número de copias constante por cada célula y regular su propia tasa de replicación (19). La resistencia antimicrobiana en *K. pneumoniae* es atribuida en gran parte a la adquisición de plásmidos de gran tamaño usualmente auto-conjugativos. En los primeros estudios en los que se realizó la tipificación bacteriana de la clona pandémica *K. pneumoniae* ST258, no se pudo determinar el tipo de replicación plasmídico, ya que la mayoría de los plásmidos de *K. pneumoniae* no se podían tipificar mediante el método estándar basado en PCR (20). Sin embargo, gracias a la genómica se ha logrado obtener la secuencia completa de plásmidos y se ha demostrado que *K. pneumoniae* está dotada de nuevas familias de plásmidos. La mayoría de estos nuevos plásmidos pertenecen a la familia IncF. La familia IncF se ha descrito en plásmidos identificados en todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, a menudo son de entre 60 a 200 kb, son de bajo número de copias y portan replicones adicionales relacionados con la familia IncFII (gen *repA*). Esta familia puede ser subclasificada en cuatro grupos específicos: FII (*Escherichia coli*), FIIs (*Salmonella*), FIly (*Yersinia*) y FIIk (*Klebsiella*) (21). La mayoría de los datos disponibles sobre la diversidad y distribución de plásmidos en *K. pneumoniae* provienen de estudios que utilizan la secuenciación del genoma completo utilizando lecturas cortas (3). Estos estudios han arrojado información sobre los tipos de replicón o grupos de incompatibilidad (Inc) y variantes del gen *mob* (relaxasa). Además, se ha demostrado que la carga y la diversidad de plásmidos son significativamente mayores en las clonas multidrogo resistentes que en las clonas hipervirulentas u otros grupos clonales (**Figura 2**).

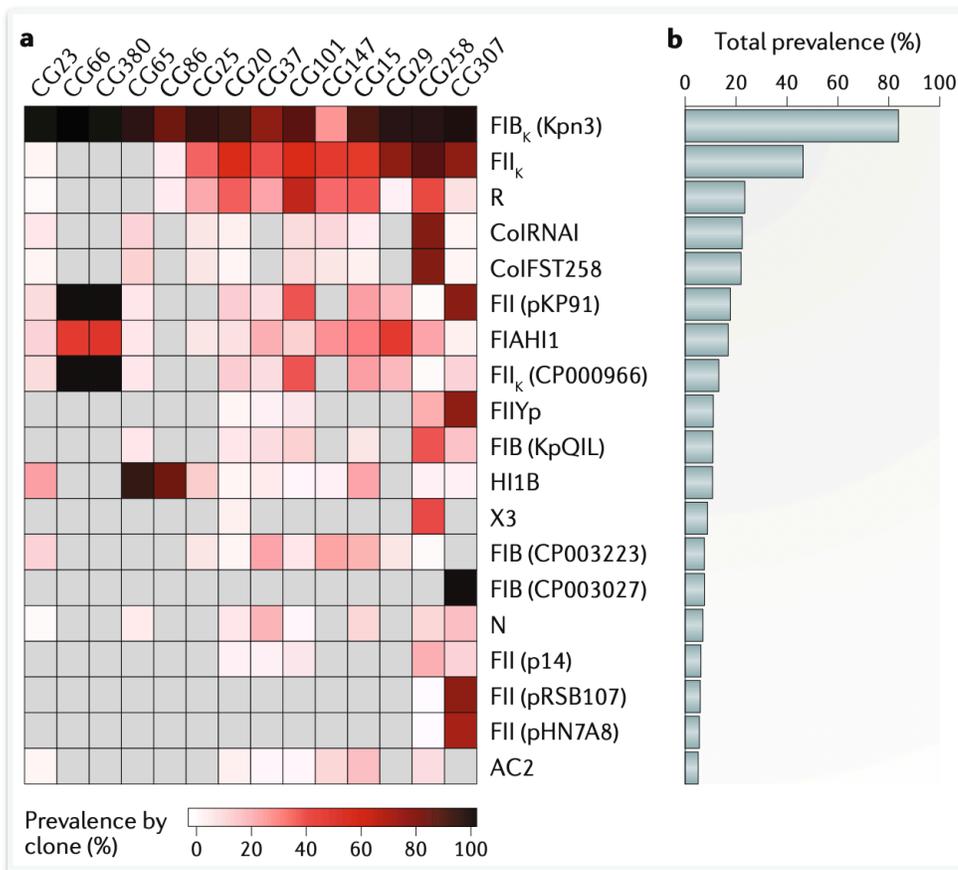


Figura 2. Distribución de plásmidos en clonas de importancia de *K. pneumoniae*. **(a)** Mapa de calor representando la distribución de replicones plasmídicos con respecto a **(b)** la prevalencia de cada replicón (3).

El grupo de incompatibilidad FIB_k se identificó como el más común tanto en clonas de interés clínico (hipervirulentas y multirresistentes) como en otras clonas de *K. pneumoniae*. Con respecto a las clonas de interés clínico, se encontró que el replicón FIB_k está asociado con plásmidos de virulencia y multirresistencia. Otros replicones identificados en *K. pneumoniae*, aunque distribuidos con menor prevalencia son los pertenecientes al tipo FII_k, R (asociados con plásmidos conjugativos grandes), Col (plásmidos pequeños), FII, FIA, FIB, X3, N, HI1B y AC/2. Estudios de filogenómica sugieren que algunas clonas problemáticas han mantenido plásmidos específicos durante décadas de expansión clonal. Por ejemplo, la clonas

pertenecientes a la ST258 y la ST307 productoras de *bla*_{KPC} y *bla*_{CTX-M-15}, respectivamente portan plásmidos con replicones FIB_K y FII_K estos plásmidos se han mantenido en la población de *K. pneumoniae* ST258 y ST307 desde su descripción en 1990. De igual manera, el plásmido de virulencia KpvP-1 con el replicón FIB_K se identificó únicamente en la clona ST23.

Adicionalmente, un estudio reciente analizó 306 secuencias de plásmidos de *K. pneumoniae*; entre los cuales 27 fueron menor de 15-kb y 279 fueron plásmidos de gran tamaño. El replicón más frecuente identificado en esta colección de plásmidos fue el de familia FII_K (149/279) (15). No obstante, se encontró que el replicón FII_K estaba asociado con replicones FIB (112/149). Es de notar que el estado “multirreplicón” (más de un grupo de incompatibilidad) permite la generación de plásmidos que pueden replicarse utilizando replicones alternos, evitando el efecto de incompatibilidad debido a la presencia simultánea de dos plásmidos incompatibles que co-residen dentro de la misma célula (22).

2.4. Variantes de *K. pneumoniae*: clásica, hipervirulenta e hipermucoviscosa

Las cepas de *K. pneumoniae* comúnmente identificadas por médicos y microbiólogos se clasifican como *K. pneumoniae* clásica (KpnC). Tales cepas son conocidas por su capacidad para causar IAAS y adquirir resistencia a los antimicrobianos por lo que la mayoría de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* es debido a cepas clásicas. Las infecciones que causa esta variante son neumonías, infecciones del tracto urinario, que a veces terminan en bacteriemia y choque séptico (9). No obstante, en las décadas de 1980 y 1990, comenzaron a surgir reportes en Asia que detallaban infecciones graves adquiridas en la comunidad debidas a *K. pneumoniae* (9;23-25), esto sorprendió a los microbiólogos ya que estos casos representaban una desviación de la presentación clásica de las infecciones por *K. pneumoniae*. A esta nueva variante se le denominó “hipervirulenta” en principio por su capacidad para infectar poblaciones tanto sanas como inmunodeprimidas, pero también por la tendencia de estas infecciones a ser invasivas. La patología de *K. pneumoniae* hipervirulenta (KpnHV) es más grave que la típica de KpnC y puede presentarse como abscesos hepáticos piogénos, fascitis necrotizante, meningitis y endoftalmitis. El aspecto más sorprendente de KpnHV es su capacidad para causar infecciones metastásicas en pacientes sanos. La severidad en los cuadros clínicos se atribuye a factores de virulencia únicos en esta población, los cuales están

codificados en el genoma accesorio (9;26). Una de las características principales que posee KpnHV es la hipermucoviscosidad (hmv), característica que se evidencia por la formación de un filamento viscoso al tocar una colonia crecida en medio nutritivo, la hmv va acompañada de una sobreproducción de la cápsula (hipercápsula). En su conjunto, KpnHV presenta una estructura externa más robusta que KpnC (**Figura 3**). La hipermucoviscosidad y la hipercápsula se producen por la vía dependiente de la proteína reguladora RmpA; no obstante, la implicación de este fenotipo sobre la virulencia de KpnHV y la base genética se detalla en la sección 2.5.4. y 2.5.4.1.

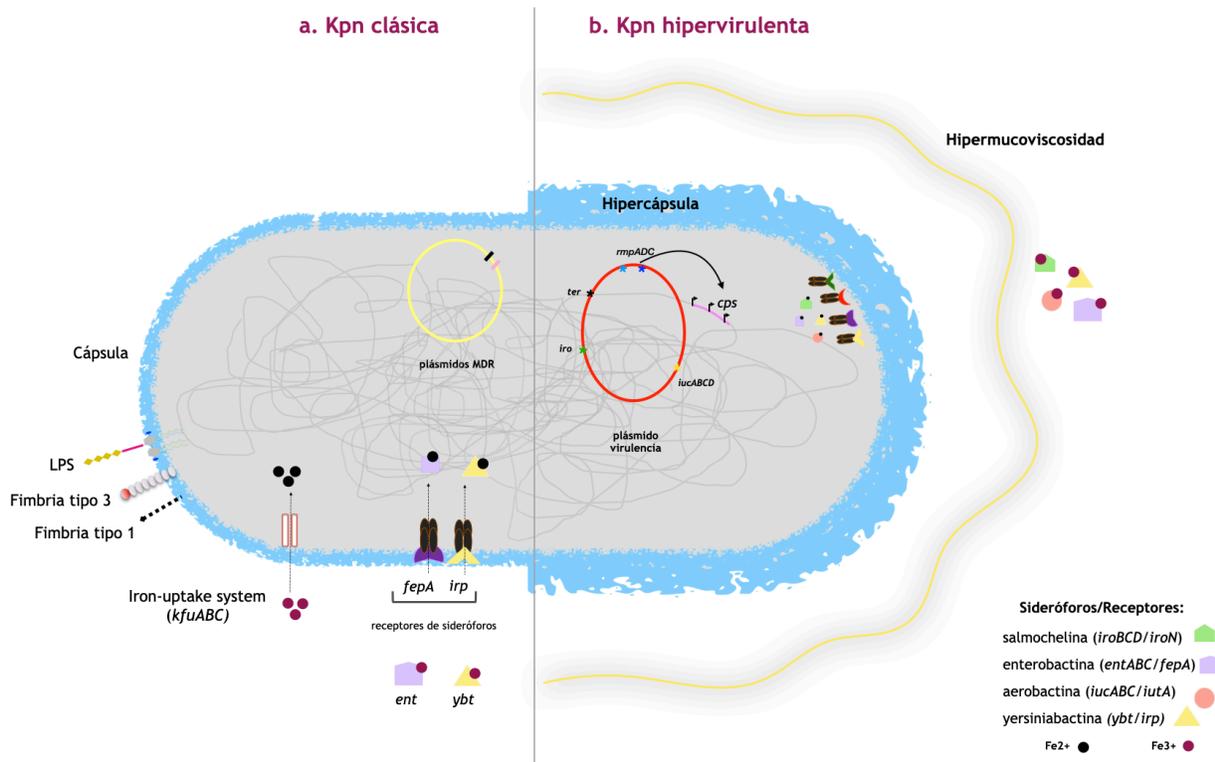


Figura 3. Factores de virulencia presentes en las variantes de *K. pneumoniae* a. clásica y b. hipervirulenta (Figura Modificada de Paczosa & Meccas, 2016).

El término hipervirulencia es utilizado para describir un fenómeno clínico de enfermedad grave causada por *K. pneumoniae* adquirida en la comunidad, que típicamente se asocia con la presencia de múltiples genes de virulencia adquiridos. Por lo que, la hipervirulencia es la suma

de características fenotípicas, genotípicas y clínicas. No obstante, hasta hace algunos años los criterios clínicos para identificar cepas de KpnHV y las infecciones asociadas eran problemáticos. Anteriormente se tomaba como principal criterio la presencia de la hipermucoviscosidad para identificar cepas KpnHV, pero varios trabajos han demostrado que la hmv no es exclusiva de KpnHV y no todas las cepas hipervirulentas son hmv (3). La concordancia entre la presencia de la hmv y la hipervirulencia evaluada en modelos animales y en estudios epidemiológicos varía entre un 51 y un 98%. Esta característica por si sola no es precisa para definir a KpnHV, Russo et al., (2018) propusieron varios marcadores para diferenciar cepas KpnHV de KpnC y de esta manera mejorar la atención clínica, la identificación de KpnHV y su vigilancia epidemiológica. Los marcadores propuestos son *peg-344*, *iroB*, *iucA*, *rmpAp* (plásmidica), and *rmpA2_p* (plásmidica), todos estos genes se encontraron altamente asociados con enfermedad grave o muerte ocasionada por KpnHV (27).

De particular preocupación es la aparición de cepas KpnHV resistentes a múltiples antibióticos; este tipo de aislamientos causa una enfermedad grave pero además son difíciles o imposibles de tratar. Los genes de resistencia a los antibióticos a menudo contenidos en plásmidos y muchos de los genes que confieren el fenotipo de hipervirulencia se transportan en plásmidos de virulencia o elementos genéticos móviles incorporados en el cromosoma en forma de islas genómicas de patogenicidad. La mejor conocida en KpnHV es ICEK ρ la cual codifica a varios sideróforos, toxinas y reguladores del fenotipo hipermucoviscoso y la hipercápsula (28). El hecho de que estos replicones se puedan transferir horizontalmente sugiere que existe un mayor riesgo de que otras cepas adquieran tanto la hipervirulencia como la multiresistencia a antibióticos.

Estudios genómicos ya han detectado la convergencia de genes de hipervirulencia y carbapenemasas en varios aislamientos (29;30). Un estudio realizado por Gu et al., identificó un brote mortal de neumonía asociada a ventilación mecánica debido a una clona de *K. pneumoniae* ST11 hipervirulenta y resistente a carbapenémicos por la presencia de KPC-2 (31). Estos aislamientos adquirieron un fragmento del plásmido de virulencia pLVPK y contenían varios factores de virulencia asociados con cepas hipervirulentas, incluidos genes que codifican los sideróforos saerobactina (*iucABCD*), salmochelina (*iroBCD*) y el gen regulador del fenotipo mucoide *rmpA* (estos factores de virulencia se detallan en las secciones 2.5. y 2.5.4.).

En contraste con las infecciones causadas por KpnC, las infecciones por KpnHV están dominadas por el mismo linaje. El más común es el CG23 (Grupo Clonal 23, formado por la ST23, ST26, ST57 y ST163 seguido del CG65 (formado por ST65 y ST375) y CG86 (**Figura 4**). Existen otros grupos clonales implicados, aunque en menor frecuencia como CG25, CG66 y CG380 (32) (**Figura 4**). Además, el CG23 está asociado con el tipo capsular K1 el cual se ha identificado altamente resistente al suero humano y con varios factores de virulencia entre ellos la genotoxina colibactina, microcina E492 y sideróforos. Otro de los tipos capsulares asociados con estos grupos clonales son el K2, K54, K57 y K20. La adquisición de cepas de KpnHV aún no está claro, pero se sugiere que la colonización parece ser un reservorio de KpnHV. La tipificación por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) de aislamientos hepáticos y fecales de pacientes con abscesos hepáticos piogénicos demuestra una relación clonal de los aislamientos. Se sugiere que estas cepas pueden haber colonizado a muchas personas, ya que al realizar una muestra aleatoria de aislamientos fecales de pacientes asintomáticos reveló algunos de los mismos tipos de PFGE observados en aislamientos de abscesos hepáticos. Estos hallazgos sugieren que, de manera similar a KpnC, las infecciones por KpnHV son causadas por cepas colonizadoras endógenas (9).

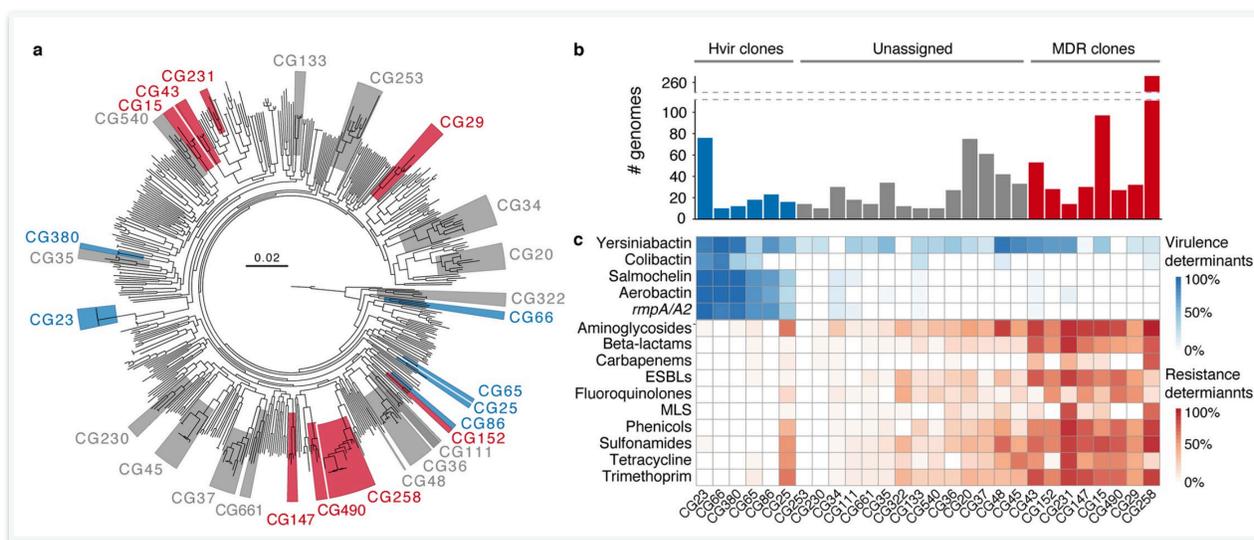


Figura 4. Estructura poblacional de *K. pneumoniae* basada en secuencias tipo (ST). **a)** Árbol filogenético inferido con el método de máxima verosimilitud de 509 STs. Los clados marcados en azul representan clones hipervirulentos y en rojo clonos multiresistentes. **b)** Número total de genomas incluido en el análisis comparativo

y **c)** distribución de determinantes de virulencia y resistencia a antibióticos y su asociación con las clonas hipervirulentas y MDR. La intensidad del color indica la proporción de genomas que codifican ya sea para virulencia (azul) o genes adquiridos que confieren resistencia a diferentes clases de antibióticos (rojo) (33).

El surgimiento de cepas con el fenotipo hipermucoviscoso sin características de hipervirulencia, atrajo la atención y cuestiona el papel que está jugando la hmv en otras variantes de *Klebsiella*. Esta tercera variante se denomina *K. pneumoniae* hipermucoviscosa (KpnHVM); no obstante, no es como tal una población reconocida por la comunidad científica de *Klebsiella*. Dado que KpnHVM no se comporta como una cepa hipervirulenta y en algunos casos se comporta como una clásica propusimos ponerla en una categoría independiente. Esta categoría incluye cepas susceptibles y multirresistentes a los antibióticos con el fenotipo hmv, las cuales pueden ser adquiridas principalmente en los hospitales. Hasta ahora se desconoce el mecanismo genético que KpnHVM utiliza para expresar la hmv y la hipercápsula, lo que se sabe es que estos procesos no están relacionados con la vía descrita en KpnHV (dependiente de RmpA) y pudiera existir más de un mecanismo que desencadene la hmv y la hipercápsula. Diversos estudios han reportado la circulación de KpnHVM en entornos clínicos. Cubero et al., (2016) estudiaron 878 aislamientos obtenidos de bacteriemias de un periodo de siete años (2007-2013). En esta colección de aislamientos se encontraron cepas hipervirulentas, pero también identificaron 25 aislamientos que pertenecieron a KpnHVM (34). Las KpnHVM de este estudio pertenecieron a diversas STs y otros tipos capsulares no relacionados con los de hipervirulencia o multirresistencia, además algunos de ellos presentaron nuevos alelos del gen *wzi* (gen esencial para la biosíntesis de la cápsula). Hallazgos similares fueron demostrados por Li et al., (2014) los autores llevaron a cabo un estudio retrospectivo en 88 pacientes hospitalizados con cultivos positivos a *K. pneumoniae*. De este conjunto, 29 aislamientos exhibieron el fenotipo hmv, de los cuales 16/29 aislamientos fueron catalogados como KpnHV debido a la presencia del gen *rmpA* y el tipo capsular K1 o K2 y 13/29 aislamientos pertenecieron a KpnHVM. Aunque en este estudio erróneamente implementan la prueba del filamento (string test) para discriminar entre KpnC y KpnHV además de que no buscan otros marcadores de hipervirulencia, es claro que dentro de la población de *K. pneumoniae* circulan

cepas KpnHMV negativas tanto a *rmpA/K1* o *K2/iuc* (24). Es de notar que además de *K. pneumoniae*, otras especies de *Klebsiella* incluso otros géneros bacterianos como *E. coli* y *A. baumannii* se han descrito con el fenotipo hmv (35;36). Más allá de ser una característica energéticamente costosa para la célula esta pudiera aportar una ventaja sobre aquellas bacterias que no presentan la hmv.

2.5. Factores de virulencia

La virulencia de *Klebsiella* se atribuye en gran parte a la presencia del lipopolisacárido (LPS), las fimbrias tipo 1 (*fim*) y tipo 3 (*mrk*), la cápsula (antígeno K) y los sideróforos (**Figura 3**) (9). A pesar de décadas de investigación, el repertorio de factores de virulencia de *K. pneumoniae* no se conoce completamente y sigue siendo pequeño en comparación con otros patógenos (37). Este conjunto de factores de virulencia está presente prácticamente en todas las cepas patógenas y los genes se encuentran codificados en el cromosoma, característica esencial para establecer infecciones oportunistas en hospederos mamíferos (26).

Los sideróforos son moléculas quelantes de alta afinidad secretadas por diversas bacterias para secuestrar hierro del ambiente. Los sideróforos son esenciales para el crecimiento de las bacterias en la mayoría de los nichos y están asociados con la severidad de la infección. Los sideróforos requieren de un receptor, el cual es el encargado de incorporar el complejo Fe^{3+} -Sideróforo. Las bacterias pueden producir ambos o solo tener el receptor en su membrana externa. *K. pneumoniae* secreta múltiples tipos de sideróforos; uno de los más comunes es la Enterobactina (*ent*); no obstante, el sistema inmune innato utiliza la lipocalina 2, una proteína que se une este sideróforo e inhibe su acción de tal manera que las bacterias limitan la adquisición de hierro (38).

Por lo tanto, las bacterias producen otros sideróforos los cuales están codificados en el genoma accesorio (usualmente plásmidos o elementos integrativos conjugativos [ICE]) (26). En estos replicones pueden localizarse sideróforos como aerobactina, salmochelina y yersiniabactina (**Figura 3**). La producción de sideróforos es una de las características que diferencia entre las variantes clásicas y las hipervirulentas, ya que esta última variante tiene la capacidad de secretar diferentes tipos de sideróforos (**Figura 3**). Se ha demostrado que aerobactina es uno de los principales sideróforos secretados por KpnHV el cual es importante

para establecer una infección sistémica, por lo que se ha considerado como un factor de virulencia crítico en cepas de KpnHV (39). La presencia de receptores de sideróforos dependientes de TonB en el genoma central de *K. pneumoniae* es muy común, se ha identificado que algunos receptores comparten ~71% de similitud con el receptor de aerobactina *iutA*; sin embargo, esto no implica que la bacteria produzca como tal el sideróforo para eso se requiere identificar los genes de la síntesis de la aerobactina (*iucABCD*) (3). Se desconoce si estos receptores son capaces de incorporar sideróforos ajenos.

Por otra parte, un paso crítico en la progresión de la infección es que las bacterias se adhieran a la superficie intestinal del huésped. *K. pneumoniae* logra esto utilizando los pili o fimbria; los cuales, son estructuras filamentosas que se extienden desde la superficie de las bacterias, de las cuales existen dos tipos: fimbria tipo 1 (*fim*) y tipo 3 (*mrk*) (**Figura 3**) (9). Se cree que los pili de tipo 1 ayudan a la virulencia a través de su capacidad para adherirse a las superficies mucosas o epiteliales humanas. Las fimbrias de tipo 3 además dar la habilidad de adherirse a las superficies celulares se han identificado como fuertes promotores de la formación de biopelículas. Tanto *fim* como *mrk* se consideran parte del genoma central (9;26). Además, se ha descrito que ambos tipos de fimbrias juegan un papel en la colonización de los catéteres urinarios, lo que lleva a infecciones urinarias asociadas al catéter (9).

El LPS conocido como endotoxina, es un componente principal que decora la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. El LPS es ampliamente reconocido como el mediador más poderoso del choque séptico causado por bacterias. Las moléculas de LPS están compuestas por lípido A, un dominio central y el antígeno O. Estos componentes están codificados por los operones *wb*, *waa* y *lpx* respectivamente (9). Las variaciones en las estructuras del antígeno O proporcionan varios serotipos O. En *K. pneumoniae* hay nueve serotipos O, tres de estos, O1, O2 y O3, son responsables de casi el 80% de todas las infecciones por *Klebsiella* (9;40). No obstante, las variaciones del LPS también pueden desempeñar un papel en la protección de las bacterias contra de los péptidos antimicrobianos y contra antibióticos como las polimixinas (26).

Finalmente, la cápsula, es quizá el factor de virulencia más importante y del que más se ha estudiado su papel en la virulencia de *K. pneumoniae*. Se han descrito varias funciones de la cápsula: 1) previene la fagocitosis y opsonofagocitosis de las bacterias por las células del

sistema inmune. II) dificulta la acción bactericida de péptidos antimicrobianos como las β -defensinas humanas y la lactoferrina al unir estas moléculas distalmente a la membrana externa y III) bloquea la interacción de los componentes del complemento, como el C3, evitando así la lisis y opsonización mediadas por el complemento (9). Las características específicamente relacionadas con la hipervirulencia además de involucrar sideróforos adicionales y resistencia al telurito también se relaciona con la presencia de una cápsula mucho más robusta que la que se presenta en cepas clásicas acompañada del fenotipo hipermucoviscoso (hmv) (**Figura 3**). Las cepas de KpnHV usualmente presentan los tipos capsulares K1 y K2, aunque se han encontrado rasgos asociados con la hipervirulencia en cepas con otros tipos capsulares como K54 (3). Dado que la cápsula es un factor de virulencia esencial para *K. pneumoniae* tanto en cepas hipervirulentas como en cepas clásicas, la identificación de nuevos fenotipos asociados a ella como la hipermucoviscosidad e hipomucosidad que resultan en un incremento de la virulencia ha sido foco de investigación en años recientes por los desafíos clínicos que representan cuando convergen con la multirresistencia de *K. pneumoniae*. En las siguientes secciones detallaremos los aspectos más importantes de la cápsula.

2.5.1. Cápsula

La cápsula es una estructura que se encuentra en el exterior de la célula bacteriana adherida a la membrana externa. Es uno de los factores de virulencia más importantes utilizado por *K. pneumoniae*. Su función consiste en ayudar a evadir el sistema inmunológico durante la infección, protegiendo a las bacterias de la opsonofagocitosis y resistencia a la acción del complemento (26). La cápsula es sintetizada por el locus de síntesis de polisacáridos capsulares (*cps*) (**Figura 5**) y está compuesta por subunidades repetidas de cuatro a seis azúcares, así como ácidos urónicos (ácido glucurónico y ácido galacturónico) (2). En base a pruebas serológicas, se han identificado 77 tipos capsulares (41). Los estudios de genómica comparativa a gran escala han revelado una heterogeneidad en el contenido de los genes responsables de la biosíntesis de la cápsula de tal manera que se han identificado 138 tipos capsulares (40;42).

La maquinaria de síntesis de la cápsula está conservada en la mayoría de los CPS; no obstante, es específica del tipo capsular y está codificada por un conjunto de genes muy diversos. Por

tanto, la síntesis capsular se lleva a cabo mediante una combinación de genes centrales y accesorios (26;43).

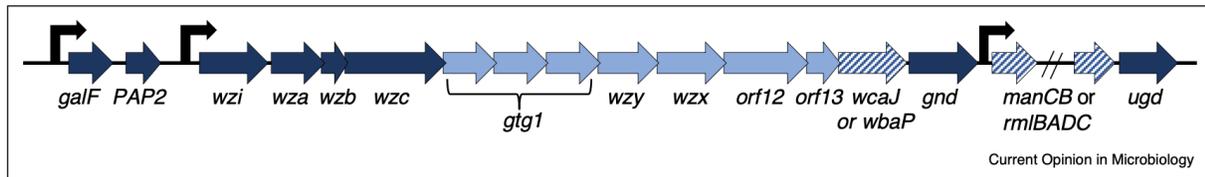


Figura 5. Organización de los genes del *cps*. El CPS contiene tres promotores caracterizados indicados con las flechas negras. Los promotores se encuentran río arriba de *galF* (también denominado orf 1-2), *wzi* (orf 3-15) y *manC* (orf 16-17). Los genes en azul oscuro están muy conservados entre los diferentes tipos capsulares; los de color azul claro son específicos del tipo de cápsula, y los de trama azul oscuro pueden variar según los precursores de azúcar que componen la cápsula. Los orf 12 y 13 parecen ser exclusivos de *Klebsiella* (43).

Los genes del CPS cumplen tres funciones principales: i) síntesis de azúcares precursores, ii) formación de unidades repetidas de azúcares, iii) ensamble (polimerización) y iv) exporte del polisacárido (44;45). La síntesis de la cápsula en *Klebsiella* se lleva a cabo a través de la vía dependiente de Wzy/Wzx; a través de los siguientes pasos: **(1)** El inicio de este proceso es llevado a cabo en la interfaz entre el citoplasma y la membrana interna por las glicosiltransferasas (GT) WcaJ (en el caso del tipo capsular KL1) o WbaP (para otros tipos capsulares) que ligan el primer residuo de glucosa (WcaJ) o galactosa (WbaP) a un acarreador lipídico, el undecaprenil difosfato (und-PP). **(2,3)** A continuación, otros oligosacáridos como la fucosa o ácidos urónicos (ácido glucurónico y ácido galacturónico) son adicionados al und-PP por otras GTs (WbaZ, WcaO y WcaN). **(4)** Las unidades repetidas ligadas a und-PP son

volteadas a través de la membrana interna hacia el espacio periplasmático por la flipasa Wzx (46).

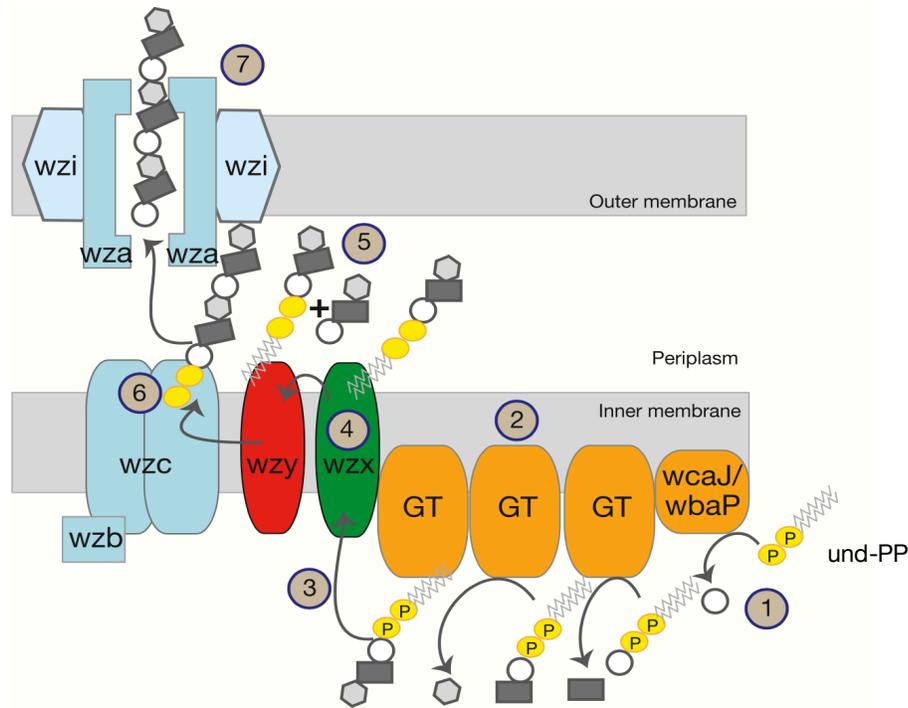


Figura 6. Modelo para explicar la biosíntesis de la cápsula mediante la vía dependiente de Wzx/Wzy (46).

(5) Este paso provee de los sustratos para llevar a cabo la polimerización de otras unidades de trisacáridos unidos a und-PP por Wzy; el polímero va creciendo por la transferencia de las unidades repetidas ligadas a und-PP. (6) Para que la polimerización continúe se requiere de la fosforilación de residuos de tirosina localizados en el extremo C-terminal de Wzc por lo que esta proteína regula el tamaño de la cadena; y la desfosforilación de Wzc por la fosfatasa Wzb. El polisacárido es trasladado hacia la superficie bacteriana por Wza (lipoproteína integral de membrana externa) la cual actúa como un canal. (7) Finalmente, la cápsula es anclada a la superficie bacteriana por Wzi (Figura 7). La diversidad de las GTs varía entre cepas dando como resultado diferentes combinaciones de oligosacáridos y modificaciones de residuos. Estas diferentes combinaciones de residuos resultan en los diferentes tipos capsulares (46). La tipificación de la cápsula en *K. pneumoniae* ha sufrido modificaciones ya que anteriormente se propusieron esquemas basados en serología o en el análisis de la secuencia de un solo gen

como el *wzi* o el *wzc*; no obstante, estudios recientes en análisis masivo de genomas han llevado a la conclusión de que es más robusta la tipificación cuando se utiliza la secuencia completa del CPS. Hasta la fecha se han identificado más de 138 combinaciones distintas, cada una de las cuales define un locus K o KL (cuando se usa el genoma para determinar el tipo capsular) distinto que se cree que codifica un tipo de cápsula distinto, pero solo 77 de ellas se han distinguido mediante la tipificación serológica tradicional (42).

Se ha determinado que el CPS de *K. pneumoniae* es altamente diverso (**Figura 5**) incluso el número de KLS excede a los descritos en *A. baumannii* y *S. pneumoniae*. Es de resaltar que la diversidad del CPS es en órdenes de magnitud mayor que la descrita recientemente para el LPS, otro de los principales polisacáridos de superficie de *Klebsiella* (40). Esto sugiere que la cápsula de *K. pneumoniae* está sujeta a una fuerte presión de selección que resulta en la diversificación de la cápsula. Dado que las especies de *Klebsiella* no son patógenos obligados y son ubicuos en entornos ambientales (2), los factores que impulsan la diversificación pueden no ser las presiones impuestas por el sistema inmunológico del hospedero si no que pueden estar determinadas por la presencia de fagos y / o otros protistas (42).

Algunos tipos capsulares como los KL1 y KL2 están asociados con enfermedad invasiva y una mayor patogenicidad en modelos murinos. El KL1 y KL2 están muy conservados en clonas hipervirulentas (K1 en CG23 y K2 en los demás); sin embargo, se sabe poco sobre la virulencia de las cepas que exhiben otros tipos capsulares. La mayoría de los clonas no hipervirulentas, incluidas las clonas MDR, exhiben una elevada diversificación de la cápsula. Una excepción notable es GC307, que hasta ahora siempre lleva el KL102, así como un locus de síntesis de cápsula putativo adicional que tiene una estructura distinta a la de K-locus y es raro en la población más amplia de *K. pneumoniae* (3). La deficiencia de la cápsula es considerada una desventaja para la bacteria, pero algunos estudios han demostrado que diferentes fenotipos capsulares no siempre resultan en un efecto perjudicial para la bacteria. En una colección de aislamientos MDR de *K. pneumoniae* ST258 productoras de KPC-2, Ernst et al., (2020) demostraron que *K. pneumoniae* puede aumentar su patogenicidad adoptando dos fenotipos opuestos que son fácilmente adquiridos por mutaciones que resultan en la pérdida y ganancia de funciones (47). Como, por ejemplo; cambios de un solo nucleótido en el gen *wzc* conllevan a la producción de hipercápsula o hipermucoviscosidad (esta característica se detalla en la

sección 2.5.4). Este fenotipo confiere resistencia a la fagocitosis, aumenta la diseminación e incrementa la mortalidad en diferentes modelos murinos. Además, se encontró que las cepas hipercapsuladas estuvieron asociadas con bacteremias. Por el contrario, los autores identificaron 11 mutaciones distintas, las cuales incluyeron deleciones de los genes *wzi*, *wza*, *wzc* y más comúnmente la presencia de secuencias de inserción (IS) en el gen *wbaP*. Estas mutaciones alteraron la producción de la cápsula resultando en cepas acapsuladas (hipomucoides). Sorprendentemente, las cepas hipomucoides aumentaron la invasión de células epiteliales, la formación *in vitro* de biofilm y la persistencia de *K. pneumoniae* en infecciones del tracto urinario. Estos dos tipos de mutantes, hipomucoides e hipercapsuladas circulan naturalmente entre la población de *K. pneumoniae* y es preocupante ya que *K. pneumoniae* puede adquirir tolerancia a los antibióticos generando infecciones urinarias potencialmente intratables (47). Aquí un buen ejemplo de la convergencia de multirresistencia y patogenicidad.

Por otro lado, Tan et al., (2020) evaluaron la ventaja que provee la cápsula en cuatro mutantes afectadas en diferentes etapas de la vía biosintética Wzy/Wzx, utilizando una de las cepas de referencia hipervirulenta de *K. pneumoniae* SGH10 (KL1). Específicamente, los autores construyeron mutantes isogénicas con deleciones en los genes *wcaJ*, *wzy*, *wza* y *rmpA*. Las mutantes Δwza y Δwzy mostraron que son menos aptas (tienen menor adecuación o “fitness”) que la cepa con el fenotipo silvestre cuando colonizan el intestino. Esto sugiere que la cápsula aumenta la tasa de crecimiento de la cepa o, muy probablemente, mejora la supervivencia celular en ese entorno (intestino). Sorprendentemente, los mutantes $\Delta wcaJ$ y $\Delta rmpA$ mostraron fenotipos opuestos. En estas mutantes, la falta o reducción de la cápsula ya no es perjudicial ya que son capaces de superar a las cepas que poseen el fenotipo silvestre y poder diseminarse hacia otros órganos. Este estudio indica que la cápsula K1 en *K. pneumoniae* no es necesaria para la colonización intestinal, pero es fundamental para la diseminación a partir del torrente sanguíneo hacia a otros órganos (mutantes $\Delta wcaJ$ y $\Delta rmpA$), como el pulmón, el bazo y el hígado (48).

2.5.2. Organización de la cápsula

Se creía que las cápsulas cubrían toda la superficie de la célula, como se ha mostrado típicamente en dibujos animados y en algunas imágenes obtenidas por microscopía. Estudios recientes sugieren que la producción de la cápsula proviene de focos discretos en la superficie de la célula y no se difunde alrededor de la superficie celular cubriéndola uniformemente (46). Phanphak et al., (2019) a través técnicas de microscopía de alta resolución y cromatografía de dispersión de luz de alta presión mostraron que la cápsula de *E. coli* K1 (que se secreta a través de la misma vía de biosíntesis Wzy/Wzx) forma balsas o cepillos discretos en la superficie de la célula y que además muestra un grosor bimodal en las balsas localizadas en la region polar, es decir, diferentes grosores en la estructura capsular en contraste con el grosor encontrado en la region ecuatorial monomodal como se muestra en la **Figura 7** (49). Estos hallazgos han roto paradigmas y cuestionan las funciones básicas de la cápsula ya que la protección que esta provee pudiera ser menos efectiva si se organiza en parches o en ramilletes en lugar de cubrirla por completo. No obstante, esto respaldaría la hipótesis de que las cápsulas no fueron seleccionadas por la ventaja en su adecuación que brindan dentro del hospedero, sino que serían un subproducto de la adaptación fuera de él (50).

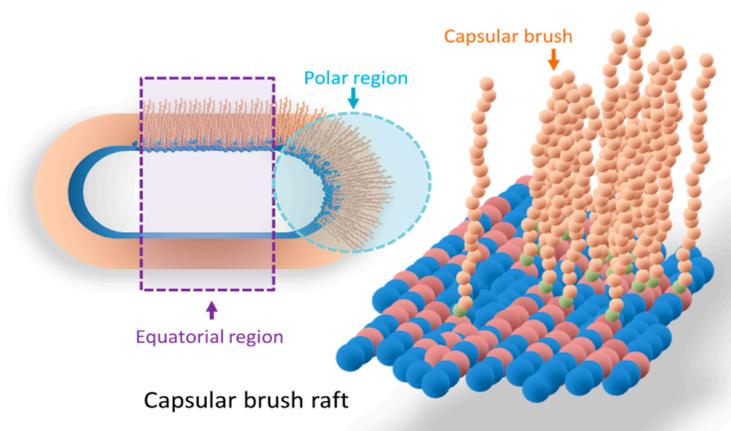


Figura 7. Modelo propuesto por Phanphak et al., para la organización de la cápsula de *E. coli* K1

Además, la organización capsular en los ramilletes también proporcionaría una explicación a hallazgos recientes que sugieren que las cápsulas no limitan la transferencia horizontal de genes en la mayoría de las especies bacterianas, porque los parches de la superficie celular aún permanecen expuestos a fagos o pili conjugativos (51).

2.5.3. Regulación de la producción de la cápsula

La producción de la cápsula es un proceso complejo en el que varios genes controlan colectivamente la producción de la cápsula. Los genes que codifican a las proteínas responsables de la síntesis de los azúcares, la polimerización y el transporte de la cápsula desde la membrana interna hacia la externa son regulados a nivel transcripcional (52).

Hasta hace pocos años no estaba claro cómo se llevaba a cabo la regulación de la cápsula, se creía que el sistema de fosforilación Rcs era el único responsable de llevar a cabo este proceso. Dorman et al., (2018) diseñaron un sistema robusto que permitió identificar los genes que influyen en la producción de la cápsula. Mediante la técnica de densidad-TraDISort, que combina la centrifugación en gradiente de densidad con la secuenciación masiva de los sitios adyacentes de la inserción de transposones, los autores investigaron la regulación de la cápsula en dos cepas hipervirulentas, *K. pneumoniae* NTUH-K2044 (KL1) y *K. pneumoniae* ATCC 43816 (KL2). Los autores identificaron múltiples genes necesarios para la producción completa de la cápsula entre los cuales se encontraron reguladores globales, genes metabólicos y componentes de la superficie celular sumando 78 genes involucrados. Dentro de los reguladores globales se identificaron el sensor de cinasa ArcB, el sistema de respuesta a estrés osmótico OmpR-EnvZ, el sistema BarA-UvrY, el represor de arginina ArgR, el sRNA de almacenamiento de carbono CsrB y los reguladores transcripcionales MprA (KvrB) y SlyA (KvrA). En cuanto a los genes metabólicos, se incluyen genes que codifican proteínas que participan en la cadena de transporte de electrones, enzimas glicolíticas y el regulador de la fuente de nitrógeno GlnB; los knockouts en estos genes generan mutantes con deficiencia en la cápsula. Por otro lado, se identificaron mutantes de NTUH-K2044 en las que la producción de la cápsula aumentó, en esta categoría se identificaron proteínas de tipo histona (H-NS), transportadores unidos a la membrana como SapBCDF y varias proteínas metabólicas (PurA,

GlnD, PtsN entre otras). Curiosamente, se observó que CsrD (actúa sobre CsrB para su degradación), H-NS (que es antagonizado por SlyA) y GlnD (modifica y controla la actividad de GlnB), son antagonistas o reguladores conocidos de genes que disminuyen la producción de la cápsula. Finalmente, sus resultados también incluyeron muchos genes que codifican para otros componentes de la superficie celular; entre ellos se identificaron genes para la síntesis y modificación de LPS que afectan la retención de la cápsula (operon *arn*), la producción del antígeno común enterobacteriano (ECA) y la lipoproteína Lpp (52).

Es de notar que algunos de los genes reguladores de la cápsula de *K. pneumoniae* ATCC 43816 fueron distintos a los identificados en *K. pneumoniae* NTUH-K2044. Los genes que se identificaron como necesarios para la producción de cápsula en *K. pneumoniae* ATCC 43816 pero no la producción de cápsula en *K. pneumoniae* NTUH-K2044 incluyeron los genes transportadores ABC *yrbCDEF* (*mIaCDEF*) y el gen *mIaA*, que participan en el mantenimiento de la asimetría de la membrana externa a través del reciclaje de fosfolípidos. Por el contrario, 32 genes se encontraron en *K. pneumoniae* NTUH-K2044 pero no en *K. pneumoniae* ATCC 43816. Esto se traduce a que el circuito regulatorio de la cápsula pudiera ser específico de cada cepa, lo que hace más complejo el proceso de producción de la cápsula. Este hallazgo fue sorprendente ya los autores ampliaron la comprensión de cómo se regula la cápsula en este patógeno de importancia médica y además demostraron que la producción de la cápsula en *K. pneumoniae* está en el centro de compleja red regulatoria donde la mayoría de los genes reguladores se encuentran codificados en el genoma central de la bacteria (**Figura 8**). No obstante, se identificaron dos nodos principales para el control transcripcional en los que convergen el resto de los genes; estos fueron los sistemas de utilización de la fuente de carbono CsrB y Rcs. Cada uno de ellos está regulado por múltiples genes identificados en el estudio de Dorman et al., (2018). Brevemente, CsrB integra señales del sistema de dos componentes UvrY-BarA (mutantes en este sistema produjeron menos cápsula) y varios genes metabólicos de carbono; CsrB es activado por DksA y es degradado por CsrD (en este caso las mutantes produjeron más cápsula); el sistema Rcs es inducido por la mutación de MdoGH, pero también puede cooperar con RmpA y RmpA2 para inducir la producción de la cápsula a un mayor nivel; Rcs también responde al metabolismo del carbono y algunas formas de antígeno común enterobacteriano. Estudios previos han demostrado que SlyA/KvrA y

negativos previstos sobre la transcripción del locus de la cápsula. Las flechas grises indican entradas que pueden afectar la síntesis de la cápsula sin modular la transcripción. Se omiten los genes biosintéticos de cápsulas individuales, los genes biosintéticos de ECA y los componentes de la maquinaria de transcripción y traducción (52).

2.5.4. La hipermucoviscosidad: un fenotipo asociado a la cápsula

Dos características que distinguen las cepas de *K. pneumoniae* clásicas de las hipervirulentas (hv) son el número de sideróforos que producen y la abundancia de su cápsula. Con respecto a esta última característica, las cepas hv producen una cápsula muy gruesa asociada a un fenotipo hipermucoide llamado hipermucoviscosidad (hmv). Esta característica se puede observar por la formación de un filamento viscoso ≥ 5 mm al tocar una colonia (prueba de filamento o string test). Dado que la prueba de filamento es meramente cualitativa, se ha propuesto el método de sedimentación a baja centrifugación para cuantificar el grado de hmv de una cepa (43). Usualmente las cepas hmv no sedimentan a baja centrifugación y muestran sobrenadantes turbios a diferencia de las cepas no-hmv.

La hmv se ha asociado principalmente con cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* con los tipos capsulares K1 y K2, sin embargo se han identificado más de 130 tipos capsulares y en varios de ellos también se han descrito cepas de *K. pneumoniae* con el fenotipo hmv (43).

La hmv se consideraba una característica casi exclusiva de *K. pneumoniae* hipervirulenta; no obstante, la descripción de otras especies y géneros bacterianos como *K. variicola*, *K. quasipneumoniae*, *K. oxytoca*, *A. baumannii* y *E. coli* con este fenotipo demuestra que la hmv no necesariamente es una característica que implique hipervirulencia (5;35;36;56;57).

La hmv es un fenotipo que usualmente va acompañado de una sobreexpresión de la cápsula por lo que anteriormente se consideraba que la hmv era cómo tal la sobreproducción de la cápsula. Se propuso que tanto la biosíntesis de la cápsula como la producción de la hmv son diferentes procesos gobernados por algunos genes en común, de tal manera que la cápsula funciona como un andamio para que la hmv se acomode, no puede haber hmv sin cápsula. Hasta el momento se desconoce qué es la hmv y cuál es su composición. En algunos trabajos se propone que este material extracelular pudiera estar compuesto de polisacáridos diferentes a los que componen la cápsula, pero se requieren algunas de las enzimas biosintéticas del *cps* para producir este material. Otra posible explicación que se proporciona es que la hmv sea una

forma modificada de la cápsula y la presencia de algunos reguladores como RmpD influyan en la síntesis o exportación del polisacárido modificado para formar la hmv (37;58;59). La hmv es un factor de virulencia esencial en cepas hv para establecer infecciones en ratones inmunocompetentes y sugiere que la cápsula, aunque ciertamente proporciona protección contra las defensas del hospedero, es insuficiente para establecer una infección letal en ratones (59). La hmv está ligada particularmente a la habilidad antiadherente de la bacteria hacia los macrófagos lo que impacta la fagocitosis. No obstante, el papel que desempeña la hmv en otras especies no hv como *K. quasipneumoniae*, *K. variicola* o *K. oxytoca* no se ha investigado, pero pudiera contribuir de igual manera a la virulencia o como un mecanismo de defensa en respuesta al estrés del ambiente.

2.5.4.1. Reguladores del fenotipo hipermucoviscoso

La proteína RmpA se describió por primera vez en 1989 como un regulador del fenotipo mucoide (58;60) y desde entonces se ha relacionado con cepas hipervirulentas que poseen el fenotipo hmv, pero hasta hace pocos años no se comprendía su función exacta (61). RmpA es un regulador transcripcional de tipo LuxR codificado frecuentemente en plásmidos de virulencia de *K. pneumoniae* o en islas genómicas en forma de elementos integrativos conjugativos denominados ICEKp (Integrative Conjugative Elements in *K. pneumoniae*, detallado en la sección 2.6); en algunos casos RmpA puede identificarse en ambos replicones (28;58;62). Si bien la fuerte correlación entre la presencia de RmpA y la hipervirulencia lo ha convertido en un biomarcador clave para definir a KpnHV (27).

Chen H.Y. et al., (2010) determinaron que RmpA activa la producción de la capsula en una manera dependiente de RcsB (64). Por otro lado, la participación de RmpA2 una proteína que exhibe el 80% de similitud con RmpA, fue descrita como un activador que aumenta la biosíntesis de la cápsula en la cepa de KpnHV CG43 (63). No obstante, no se ha esclarecido a detalle el papel de tener tanto RmpA como RmpA2 sobre la hmv y producción de la cápsula. Estudios previos establecieron que la delección del gen *rmpA* disminuye la expresión de los genes de la cápsula (*cps*) y reduce la hmv en cepas de KpnHV (61;64). Recientemente Walker et al., (2020) analizaron los fenotipos dependientes de *rmpA* en la cepa KPPR1S un derivado de la cepa hipervirulenta *K. pneumoniae* ATCC 43816 y la participación de dos genes que no

habían sido descrito como reguladores de la expresión de la cápsula y de la hmv (37). En este trabajo, Walker et al., (2020) confirmaron que tanto RmpA y RcsB regulan la expresión génica de la cápsula en KPPR1S como había sido previamente reportado; las mutantes en *rscB* y *rmpA* son hmv negativas y tienen una expresión reducida de la cápsula. Walker et al., (2020) demostraron que la expresión de *rmpA* depende de otros genes reguladores como RcsB, KvrA y KvrB, que en su conjunto forman una cascada regulatoria que contribuyen a la regulación de la cápsula mediante la activación del promotor de *rmpA*. Los genes *kvrA* y *kvrB* son reguladores que pertenecen a la familia MarR que se encuentran tanto en las cepas clásicas como en las hipervirulentas, pero parecen regular la síntesis de la cápsula sólo en las cepas hipervirulentas. Además, identificaron que *rmpA* se encuentra en un operón con otros dos genes denominados *rmpC* y *rmpD* los cuales se cotranscriben a partir del mismo promotor que está regulado positivamente por *rmpA* (37) y en el caso de *rmpC*, está codificado río abajo de *rmpA* y *rmpD* se encuentra entre *rmpA* y *rmpC*. Un dato interesante que resalta en este trabajo es que la delección del gen *rmpC* da como resultado una disminución de la expresión de la cápsula, pero curiosamente, la mutante $\Delta rmpC$ conserva el fenotipo hmv (59). De igual manera, la introducción de un plásmido que contiene *rmpC* a la cepa $\Delta rmpA$ eleva la expresión del *cps* pero la hmv de la cepa sigue siendo negativa. Este resultado proporciona evidencia de que la producción de la cápsula es un proceso distinto al proceso que conduce la hmv y sugiere que la hmv no es simplemente una consecuencia de la producción elevada de la cápsula. Por otro lado, mostraron que la sobreexpresión de *rmpA* (pRmpA) en $\Delta rmpA$, $\Delta rmpC$ y la cepa silvestre KPPR1S resulta en un aumento significativo de la hmv en las tres cepas; pero solo en la cepa $\Delta rmpA$ se restablece la producción de la cápsula en niveles similares a los de la cepa silvestre; no obstante, en la cepa KPPR1S no se observó ningún cambio con respecto a los niveles de expresión de la cápsula pero sí con respecto a la hmv con un incremento de 1-log (37). Estos datos sugieren que (i) el gen *rmpA* es un determinante importante para producir la hmv pero no el gen *rmpC*, (ii) la expresión “normal” del gen *rmpA* es necesario para de la cápsula, (iii) la expresión reducida de *cps* en la cepa $\Delta rmpA$ es probablemente una consecuencia de la expresión reducida de *rmpC* en lugar de la regulación directa por *rmpA*, (iv) los niveles altos de expresión de *cps* no son necesarios para conferir la hmv y (v) el gen *rmpC* es necesario para una expresión completa del *cps*.

Por otro lado, la identificación de la proteína pequeña RmpD, que es esencial para producir la hmv pero no para la cápsula, fue una de las aportaciones más relevantes de este trabajo ya que deja claro que tanto la cápsula y la hmv son procesos separados (59). RmpD consta de 58 residuos de aminoácidos con un dominio transmembrana N-terminal cargada positivamente en la parte C-terminal. RmpD se conserva en otras cepas de *K. pneumoniae* hv como la NTUH-K2044 y CG43 (59). El mutante $\Delta rmpD$ no es hmv, no tiene cambios en la expresión de *cps* y produce la misma cantidad de ácido urónico (cápsula) que la cepa parental KPPR1S. La expresión de *rmpD* en trans complementa a las mutantes $\Delta rmpD$ y $\Delta rmpA$ para restablecer la hmv, lo que sugiere que RmpD es el impulsor clave de este fenotipo. Estos datos, sugieren un modelo en el que los fenotipos asociados a RmpA se deben en gran medida a que RmpA activa la expresión de *rmpD* para producir la hmv y *rmpC* para estimular la expresión del *cps*. *rmpD* es transcrito a partir del promotor de *rmpA* y, por tanto, también está regulado por RmpA. Walker et al., (2020) proponen que la pérdida de expresión de la hmv y *cps* observada en las mutantes de *rmpA* se debe a la reducción de la transcripción de *rmpD* y *rmpC*, respectivamente, y que la contribución de RmpA a estos fenotipos es como activador de este operón (59).

El impacto que tienen las deleciones de los diferentes genes del operón *rmpADC* refleja una clara atenuación de la virulencia. Para analizar las diferencias en los patrones de virulencia se utilizó un modelo de neumonía en ratón con el objetivo de evaluar el impacto *in vivo* de las mutantes $\Delta rcsB$, $\Delta rmpA$, $\Delta rmpC$ y $\Delta rmpD$. Se inocularon ratones C57BL/6j por vía intranasal y se determinó la carga bacteriana a las 24 y 72 h post-infección en los pulmones y el bazo. Los resultados revelaron una drástica atenuación de las cepas $\Delta rmpA$ y $\Delta rcsB$ ya que en estos órganos se observó una disminución significativa de la carga bacteriana en comparación con la cepa parental KPPR1S. Por el contrario, la mutante $\Delta rmpC$ mostró un comportamiento distinto ya que el nivel de atenuación observado no fue tan severo, a pesar de la disminución en la expresión de *galF* y *manC* (componentes esenciales para la producción de la cápsula) y los niveles de producción de ácido urónico. La complementación cromosómica de los genes *rmpA* y *rcsB* restauró la carga bacteriana en bazo y pulmón a niveles equiparables que la cepa KPPR1S. De igual manera, la complementación en trans de *rmpC* restaura los defectos en la virulencia de la mutante (37;59).

Con respecto a la mutante $\Delta rmpD$, Walker et al., (2020) mencionan que es esencial para la virulencia *in vivo*. En un modelo de neumonía a las 24 h posteriores a la inoculación (hpi), la mutante $\Delta rmpD$ se recuperó de los pulmones aproximadamente 4 logaritmos inferiores a los de la cepa WT y se eliminó a las 72 h. En el bazo, la mutante $\Delta rmpD$ se recuperó a las 24 h en números más bajos que la cepa WT. A las 72 h, la cepa WT colonizó el bazo a $\sim 10^8$ UFC y no se recuperó la mutante $\Delta rmpD$. Una cepa con el gen *rmpD* complementado en el sitio nativo se comportó como la cepa WT, lo que indica que los defectos observados en $\Delta rmpD$ se debieron a la pérdida del gen *rmpD*. Uno de los fenotipos de virulencia asociados con la cápsula es el bloqueo de la adherencia y la fagocitosis, por lo que además de los modelos de infección sistémica se realizaron ensayos de adherencia y fagocitosis (37;59).

En resumen, el operón *rmpADC* codifica funciones diferentes afectando diferencialmente la hmv y la cápsula. RmpA es necesario tanto para la elevada producción de la cápsula como para la hmv; no obstante, RmpD está directamente involucrado en conferir el fenotipo hmv mientras que RmpC participa en la sobreproducción de la cápsula, pero no tiene ningún efecto sobre la hmv.

Un estudio reciente llevado a cabo por Mike et al., (2021) aborda desde otra perspectiva la relación que existe entre la cápsula y la hmv (65). Los autores generaron un banco de mutantes ordenado y condensado mediante el enfoque de combinación cartesiana y secuenciación por coordenadas (CP-Cseq) de la cepa hipervirulenta e hipermucoviscosa *K. pneumoniae* KPPR1. Esta biblioteca se examinó para detectar mutantes con defectos en la biosíntesis de la cápsula y la hmv, esto lo determinaron mediante ensayo de sedimentación, prueba de filamento y cuantificación de ácidos urónicos y se compararon con los datos de la cepa WT *K. pneumoniae* KPPR1. Las mutantes con hmv/CPS alterados se agruparon en seis categorías: hmv^{low}/CPS^{low} , hmv^{WT}/CPS^{low} , hmv^{WT}/CPS^{high} , hmv^{low}/CPS^{WT} , hmv^{high}/CPS^{high} y hmv^{low}/CPS^{high} . Los genes involucrados en dar los diferentes fenotipos observados estuvieron relacionados con diversos procesos celulares, entre ellos el metabolismo central, transporte de moléculas, ácidos nucleicos (replicación y transcripción del DNA) y síntesis de exopolisacáridos y lípidos. Dentro de la categoría de metabolismo principalmente se incluyen genes involucrados en el ciclo de Krebs, el transporte de electrones, fermentación y metabolismo de azúcares; por otro lado, se identificaron transportadores de azúcares, de

aminoácidos y de nucleósidos. Entre las mutantes de las diferentes categorías identificadas, dos (hmv^{low}/CPS^{low} y hmv^{high}/CPS^{high}) apoyan la perspectiva de que la hmv y la cápsula son procesos inter-relacionados ya que se encontraron mutantes en las que ambos fenotipos se modificaron en paralelo, es decir tanto la hmv y la cápsula i) disminuyen o ii) aumentan [i) $\Delta uvrY$, $\Delta galU$, $\Delta rfaH$, $\Delta VK055_3211$, $\Delta arnD$, Δwza , y ii) $\Delta cyaA$, $\Delta polA$, $\Delta csrD$ respectivamente]. Algunas mutantes pudieron disociar ambos procesos, entre estas se incluye piruvato deshidrogenasa, $\Delta aceE$ (hmv^{low}/CPS^{high}); succinato deshidrogenasa, $\Delta sdhA$ (hmv^{low}/CPS^{WT}); y adenilosuccinato sintasa, $\Delta purA$ (hmv^{WT}/CPS^{high}) lo que hace más compleja la biología de ambos procesos. Varios genes relacionados con con el ciclo de Krebs, el metabolismo del piruvato y de la energía celular parecen desacoplar la síntesis de la cápsula y la hmv. No obstante, no identificaron ninguna mutante que presentara hmv aumentada junto con una reducida producción de la cápsula. Este resultado, al igual que Walker et al., (2020) demuestra que la presencia de la cápsula es necesaria para que *K. pneumoniae* exhiba la hmv, aunque no descartan la participación de otros factores celulares. Así mismo, respaldan la idea de que la biosíntesis de la cápsula y la hmv están estrechamente vinculados al estado metabólico de *K. pneumoniae* y que, aunque la hmv requiere de la producción de la cápsula, no es el único factor. Está bien establecido que la cápsula de *K. pneumoniae* se requiere para ser completamente virulenta en múltiples modelos de infección incluidas la neumonía e infecciones urinarias (9;66). Mike et al., (2021) plantearon la hipótesis de que tanto la producción de la cápsula como la hmv son importantes para la virulencia total de *K. pneumoniae* y que disociar ambos procesos puede reducir el fitness *in vivo*. Para evaluar esto, seis mutantes que abarcan las diferentes categorías de hmv/CPS fueron evaluadas en un modelo de neumonía diseminada, los resultados muestran que las mutantes con producción alterada en la cápsula e hmv menos aptas además de que no fueron capaces de diseminarse a la sangre y al bazo. Particularmente, dos mutantes $\Delta sdhA$ (hmv^{low}/CPS^{WT}) y $\Delta csrD$ (hmv^{high}/CPS^{high}) a pesar de disminuir su competencia en pulmón, fueron capaces de diseminarse a sangre y bazo. A diferencia del trabajo de Walker et al., (2020) los autores mencionan que para dar un fenotipo máximo de virulencia se requiere tanto de la cápsula como la hmv. Mike et al., (2021) mostraron que la biosíntesis de la cápsula y la hmv son procesos coordinados, pero qué pueden

disociarse por medio de deleciones de algunos genes ligados al metabolismo central. Otra de las conclusiones de este trabajo es la teoría de como pudieron haber surgido los linajes hipervirulentos, los autores mencionan que el balance costo-beneficio entre una adecuada fuente de energía y la tolerancia del estrés ambiental como un sistema inmune sano pudiera explicar la emergencia de los linajes de KpnHV y su patología invasiva (65).

2.6. Plásmidos de virulencia y elementos integrativos conjugativos (ICE)

La mayoría de los patógenos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* comparten una característica en común, la de albergar plásmidos de virulencia, los cuales dependiendo de la especie incluso de la cepa pueden diferir en su contexto genético y su contribución a la patogénesis (67).

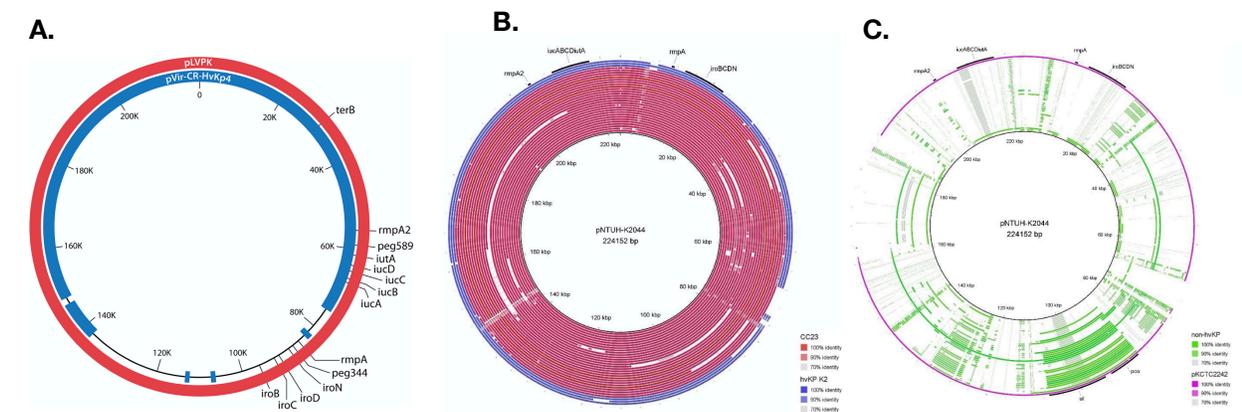


Figura 9. Plásmidos de virulencia caracterizados en *K. pneumoniae*. **A.** pLVKP (220-kb) **B.** pK2044 (224-kb), el pVir descrito por Nassif et al., (1989) no cuenta con datos de secuenciación. **C.** alineamiento del pK2044 (pNTUH-K2044) con otros plásmidos no hipervirulentos muestra que la región de virulencia es única de los pVir no obstante las regiones que pueden compartir con otros plásmidos es la región de resistencia a metales pesados principalmente plata (*sil*) y cobre (*pco*).

Particularmente, en *K. pneumoniae* los plásmidos de virulencia (pVir) se encuentran asociados a clonas hipervirulentas, por lo que en otras clonas este tipo de plásmidos no se presentan. Los pVir de *K. pneumoniae* no codifican genes de resistencia a antibióticos pero se han identificado genes que codifican resistencia a metales pesados como cobre, plata, telurito y

plomo (3). Otra de las características de los pVir es que no son auto-conjugativos por lo que la diseminación de las cepas hipervirulentas y sus plásmidos es clonal. Por el contrario, las cepas de KpnC a menudo se asocian con plásmidos que codifican genes resistencia a antibióticos, pero rara vez con plásmidos de virulencia. Los pVir mejor caracterizados en cepas KpnHV son tres (**Figura 9**), el pLVPK perteneciente a la cepa CG43 con serotipo K2 y ST86, el pK2044 perteneciente a la cepa NTUH-K2044 con serotipo K1 y ST23 y el pKP100 de la cepa 52145 serotipo K2 y ST66 que fue inicialmente descrito por Nassif et al., (1989) en los 80's. Y recientemente se propuso la cepa de *K. pneumoniae* SGH10 como una cepa de referencia para comparaciones genómicas (32).

Estos plásmidos codifican principalmente los sideróforos aerobactina (*iuc*) y salmochelina (*iro*), genes de resistencia a metales pesados (telurito y/o cobre), los genes *peg589* y *peg344* y los genes *rmpADC* y *rmpA2* encargados de la producción de la hipercápsula e hipermucoviscosidad (**Figura 9**). La convergencia de multirresistencia y virulencia en *K. pneumoniae* ha sido de particular interés debido a los reportes de algunas cepas que exhiben ambos fenotipos y la implicación clínica que estas representan (33). Una de las preguntas principales que surgió fue la de esclarecer el sentido en el que puede darse la adquisición de determinantes de virulencia y multirresistencia. Mediante análisis evolutivos y comparación genómica se propuso que es más probable que las clonas MDR adquieran genes de virulencia a que las clonas HV adquieran genes de multirresistencia (33). Lo anterior debido a que las clonas hipervirulentas restringen el flujo de genes posiblemente debido a la composición de su cápsula la cual impone una barrera que limita la transferencia horizontal de genes; no obstante, esta premisa no aplica a las clonas MDR, ya que estas adquieren con frecuencia nuevos genes a través de procesos de recombinación cromosómica, adquisición de plásmidos y bacteriófagos. En este mismo estudio se determinó que la tasa de adquisición de plásmidos de virulencia por clonas MDR supera la tasa de adquisición de plásmidos MDR por clonas hipervirulentas. De acuerdo a los estudios publicados a la fecha, la ST11 seguida de la ST36 (para el caso de clonas hipervirulentas) y la ST23 seguida de la ST86 (para clonas MDR) han sido asociadas con la convergencia de multirresistencia y virulencia (68). Otro de los escenarios que dan lugar a cepas multirresistentes y virulentas es la recombinación entre plásmidos de virulencia como el pLVPK con otros plásmidos que codifican para carbapenemasas

principalmente KPC-2 y NDM-1; estos plásmidos híbridos además de contener genes de virulencia y multiresistencia contienen el módulo de transferencia (operón *tra*) por lo que su diseminación hacia otras especies del complejo *K. pneumoniae* es posible. En *K. variicola* se han reportado dos casos de cepas hipervirulentas debido a la recombinación de plásmidos conjugativos con fragmentos del plásmido pLVPK (69), ambos casos se detallan en la sección 2.8.6.2.

También se han descrito plásmidos de cepas hipervirulentas que han integrado genes de resistencia a plásmidos residentes; un ejemplo es el estudio de Dong N et al., (2018), ellos identificaron el plásmido pKP70-2 recuperado de una cepa KpnHV con serotipo K1 y ST23, el pKP70-2 era similar al pLVPK pero se insertó una región que codifica para *bla*_{KPC-2}, flanqueada por dos copias de IS26 (70). Del mismo modo, Shen et al., (2019) reportó un caso de transposición mediada por IS903D del gen *bla*_{CTX-M-24} en un plásmido de virulencia similar al pLVPK (71). Además de los plásmidos también se han descrito otros elementos genéticos móviles que propician la diseminación de genes asociados a virulencia, llamados ICE*Kp*, de estas se han descrito 14 variantes de las cuales la ICE*Kp10* es la más prevalente entre el GC23 (32). Los ICE pueden comportarse como plásmidos y como fagos ya que pueden transferirse mediante conjugación (en forma de plásmido) y pueden integrarse y replicarse con el cromosoma del hospedero (en forma de fago). Se ha propuesto que las islas de patogenicidad (PAI) son el progenitor de los ICEs, solo que las primeras no parecen ser movilizables. El primer estudio en donde se identificó una ICE como un elemento característico de algunas cepas hipervirulentas fue el desarrollado por Lin et al., en su estudio demostraron que la ICE*Kp1* de la cepa de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 podía escindirse del cromosoma para formar un intermediario circular y posteriormente, movilizarse a otras cepas de *K. pneumoniae* ICE⁻ aportando características de virulencia. La ICE*Kp1* se encontró adyacente a un tRNA de asparagina por lo que se sugiere que la presencia de este tipo de tRNAs sea un “hotspot” para que se lleve a cabo la recombinación de fragmentos de DNA provenientes de otra bacteria. El análisis de la región ICE*Kp1* mostró la presencia de los genes de virulencia, *iroNBCD*, *ybt*, el operón *vagCD*, *rmpA*, en conjunto con los genes *virB1* a *virB11* responsable de la formación del puente conjugativo y genes para la transferencia conjugativa. También se identificó un origen de transferencia putativo (*oriT*), que se localizó a ~140 pb río arriba del gen *mobB*. Hasta

hace pocos años se pensaba que la hipervirulencia se limitaba a *K. pneumoanie*; no obstante, años más tarde *K. quasipneumoniae* adquirió el fenotipo hv por medio de eventos de recombinación mediado por ICEKp (72).

2.7. Genómica poblacional de *K. pneumoniae*

Diferentes estudios genómicos han mostrado que la población de *K. pneumoniae* es diversa pero altamente estructurada (**Figura 10**). Diversos análisis filogenéticos basados en los genes cromosómicos centrales muestran que la población de *K. pneumoniae* comprende cientos de clados filogenéticos que se agrupan en una topología en forma de estrella (**Figura 10c**); estos linajes difieren entre sí por una divergencia de nucleótidos de ~ 0.5% de como se ilustra en la **Figura 10c** (3;30).

Dichos linajes corresponden a grupos clonales definidos por secuencias tipo relacionadas. Este tipo de enfoques ha proporcionado un marco útil para comprender la epidemiología y la evolución de la variación genética de esta especie clínicamente relevante. A pesar de la alta diversidad que existe entre *K. pneumoniae* es muy clara la presencia de ciertos linajes los cuales entre ellos existe muy poca variación genética, tal es el caso de los linajes hipervirulentos formados principalmente por el GC23 y el GC86 y los linajes MDR como el GC258. Es de resaltar la heterogeneidad presente en las clonas MDR (**Figura 10a y b**), particularmente se ha identificado una elevada tasa de recombinación en el locus *cps* (gen *galF*) de clonas MDR por el contrario esto no sucede en las clonas hipervirulentas ya estas exhiben una baja diversidad de su pangenoma y están sujetos a pocos eventos de recombinación (**Figura 10a y b**) (3;30).

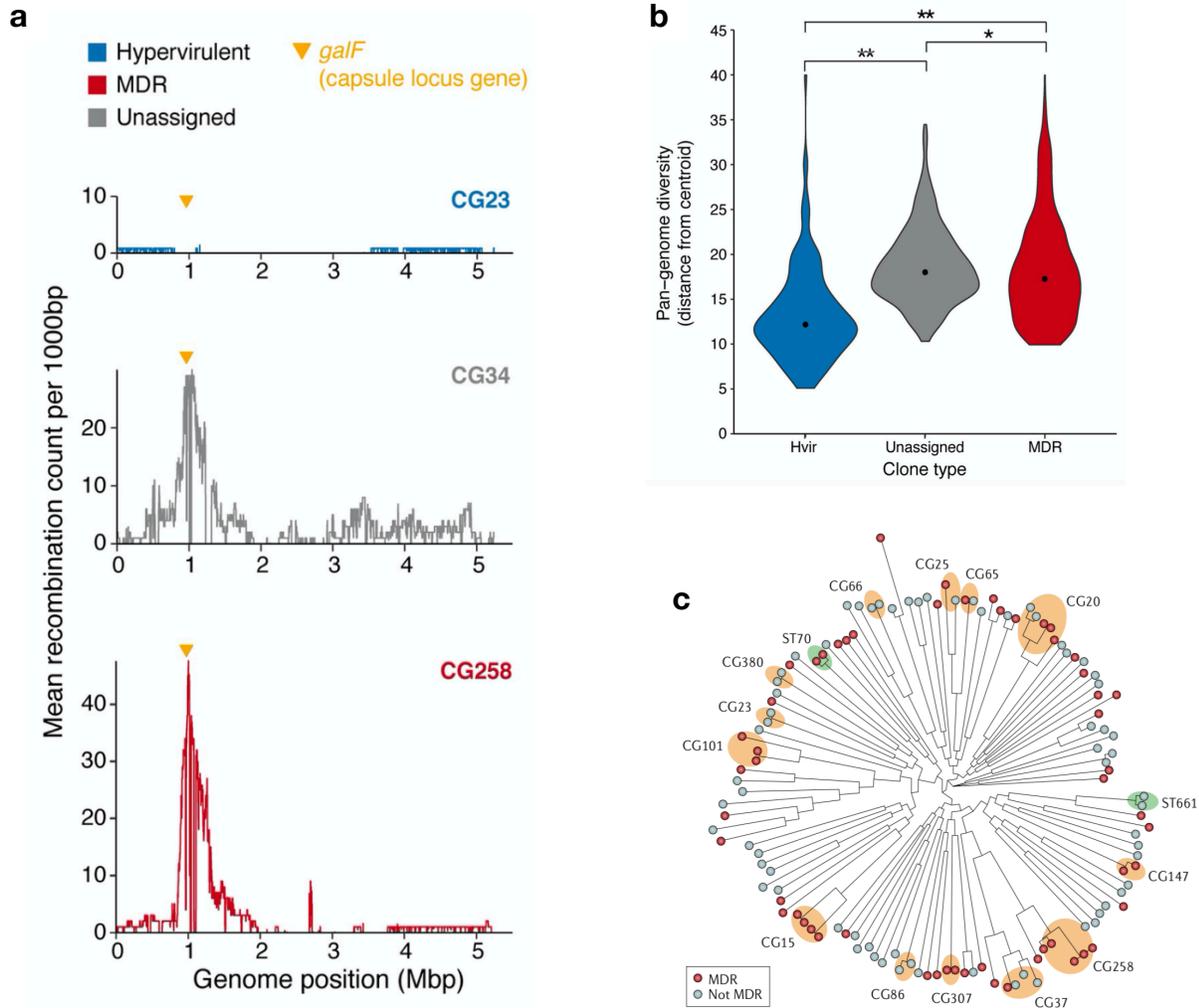


Figura 10. Diversidad y estructura de la población de *K. pneumoniae*. **a)** Gráfico que muestra la tasa media de recombinación por base a lo largo de todo el genoma de clonas de importancia de *K. pneumoniae*, las cuentas fueron calculadas por ventanas de 1000 pb. Se marca con una flecha amarilla los picos en donde se identificó mayor recombinación, esta region corresponde al loci K/O (cápsula/LPS). **b)** Diversidad en el contenido de genes en las clonas de importancia global, se muestran gráficos de violín mostrando la distribución de las distancias Euclidianas calculadas a partir de una matrix de descomposición de los genes accesorios. **c)** Clonas globales consideradas un problema a la salud pública. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el alineamiento de los genes core de 83 genomas de *K. pneumoniae* seleccionados al azar partir de un estudio global. En naranja se engloban las clonas globales problema agrupadas por Grupo Clonal (Clonal Group, CG), se incluyen 8 clonas MDR GC15, GC20, GC29, GC37, GC147, GC101, GC258 y GC307 y 6 clonas hipervirulentas GC23, GC25, GC65, GC66, GC86 y GC380. En verde se resaltan algunas clonas problemas que parecen ser propias de algunos nichos ST661 y ST70 (3).

2.7.1 Características de los grupos clonales representativos de *K. pneumoniae*

Los genomas de *K. pneumoniae* tienen un tamaño de entre ~5 Mb y codifican alrededor de 5,000-6,000 genes. Aproximadamente 2,000 genes están conservados en todos los miembros de la especie (genes core), mientras que ~3,500 genes que difieren entre genomas de *K. pneumoniae* corresponden a genes accesorios (3;30). Los genes que forman parte del “core” probablemente faciliten el amplio rango ecológico de *K. pneumoniae* al proporcionar capacidades metabólicas que le permitan la supervivencia en una amplia gama de nichos. El pangenoma (la suma de todos los genes accesorios y centrales) de *K. pneumoniae* es extremadamente diverso y algunos autores reportan que probablemente excede las 100,000 proteínas; se predice que una proporción sustancial del pangenoma codifica proteínas con funciones metabólicas; 19% asociadas con el metabolismo de carbohidratos, 18% con otras vías metabólicas y 13% con transporte de membrana (30). Esta amplia diversidad da como resultado una capacidad metabólica variable (73) que impacta en la capacidad de ampliar su nicho ecológico y proporciona aún más oportunidades para el intercambio genético. Aunado a esto, *K. pneumoniae* tiene un genoma significativamente más grande comparado con otras Enterobacterias (por ejemplo *E. coli* y *E. cloacae*) esto implica que *K. pneumoniae* ha captado genes que le permiten sobrevivir y adaptarse a diversos nichos.

La composición del DNA varía entre diferentes especies, por lo que puede ser utilizado como una firma de las especies bacterianas. El contenido de G+C de los genes core de *K. pneumoniae* es 58% mientras que los genes accesorios oscila entre 20% y 70% lo que sugiere que los genes accesorios se obtienen de una variedad taxonómica de especies (3).

2.8. *Klebsiella variicola*

K. variicola se encuentra dentro del complejo *K. pneumoniae* (**Figura 1**), debido a la estrecha relación entre estas especies, comparte muchas de las características bioquímicas y morfológicas con la especie mayoritaria del complejo. *K. variicola* fue descrita como una nueva especie hace casi dos décadas por el grupo de investigación de Esperanza Martínez Romero (74). *K. variicola* es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo e inmóvil. Forma colonias circulares, convexas y mucoides y crece a aproximadamente 11–41 °C (4). *K. variicola* es una

bacteria versátil capaz de colonizar diferentes hospederos como plantas, humanos, insectos y animales. Actualmente, *K. variicola* ha ganado reconocimiento como causa de varias infecciones en humanos, tan es así que propusimos a esta bacteria como un patógeno emergente (4). *K. variicola* también se aísla en una amplia gama de ecosistemas vegetales, participando en la fijación de nitrógeno y desempeñando un papel en la promoción del crecimiento en plantas (4;74). La clasificación errónea de los miembros del complejo *K. pneumoniae* ha limitado el estudio de *K. variicola*, enmascarando su prevalencia real y las implicaciones clínicas dentro de los sistemas de salud.

Actualmente, existen disponibles varios métodos para la identificación correctamente de esta especie, algunos de ellos están basados en pruebas moleculares como PCR de genes core y la reciente inclusión del perfil proteico de *K. variicola* a la base de datos del MALDI-TOF MS. Estudios recientes han reportado la circulación de cepas productoras de carbapenemasas y resistentes a colistina en entornos clínicos y ambientales lo que demuestra un reservorio potencial de genes resistentes a múltiples fármacos. Este hallazgo presenta un escenario inminente para la propagación de genes resistentes a los antimicrobianos entre parientes cercanos y, lo que es más preocupante, en entornos clínicos y ambientales. Desde que se identificó *K. variicola* diferentes grupos de investigación han aportado información para entender este patógeno; sin embargo, aún faltan detalles importantes sobre su epidemiología, patogenia y ecología (4).

2.8.1 Epidemiología de *K. variicola*

La prevalencia estimada de *K. variicola* es muy variable y quizá inexacta: inicialmente, se reportó una prevalencia del 8% pero esta cifra ha variado en diversos estudios desde un 1.8% hasta un 24.4% en entornos clínicos (4). El porcentaje más alto reportado hasta la fecha es del 24,4%, el cual estuvo asociado a infecciones del torrente sanguíneo en un hospital universitario en Solna, Suecia (75). Recientemente, nuestro grupo de investigación desarrollo un sistema basado en MLST que permite estudiar la epidemiología de esta especie bacteriana (76). En este estudio, se evaluaron 226 genomas obtenidos de bases de datos públicas y 28 aislamientos, que se obtuvieron principalmente de humanos, seguidos de plantas. Se identificaron un total de 166 STs. La epidemiología molecular de *K. variicola* mostró una

distribución global para algunos ST (**Figura 11 y Figura 12**), y en algunos casos, aislamientos obtenidos de diferentes fuentes pertenecieron a la misma ST.

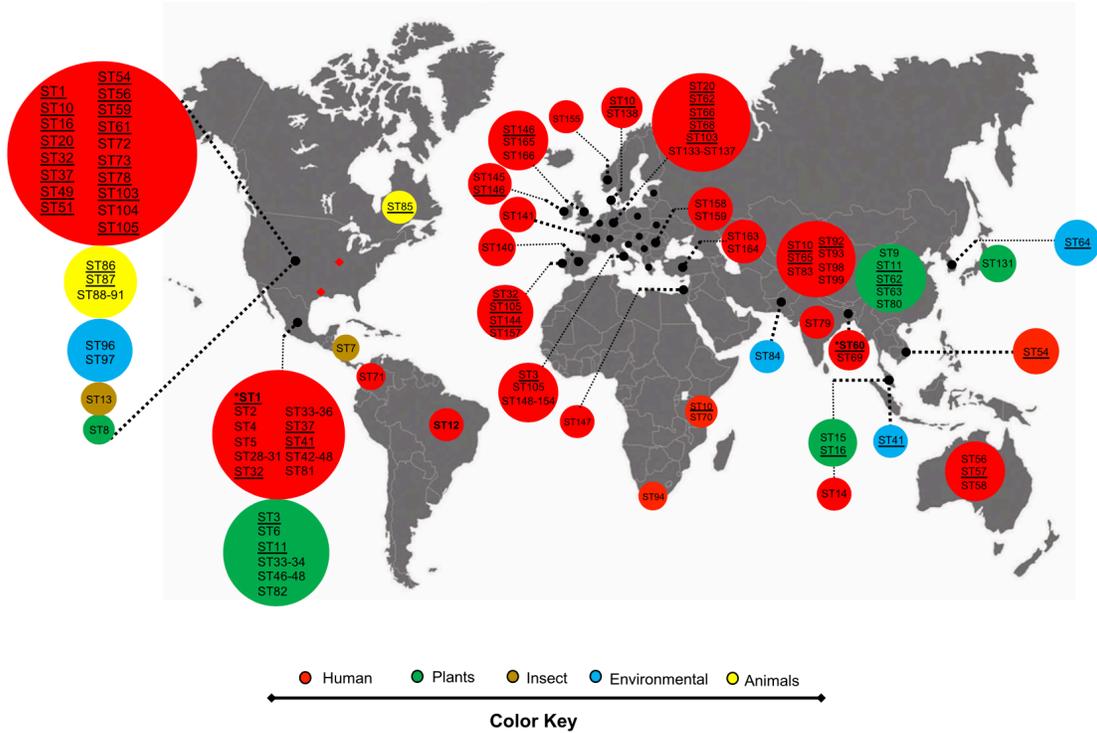


Figura 11. Epidemiología molecular de *K. variicola*. El mapa muestra la distribución de las STs al rededor del mundo. El tamaño del círculo indica el número de aislamientos que aporta dicho país.

Se ha propuesto que mediante el proceso llamado fitonosis, es decir la adquisición de bacterias propias de plantas hacia los humanos, *K. variicola* puede transmitirse por esta vía hacia los humanos y colonizarlos (4). En este estudio se identificaron varios ejemplos de aislamientos que cruzaron el reino de plantas a los humanos, tal es el caso de la ST3, ST16, y ST62 las cuales se identificaron tanto en aislamientos de plantas como de humanos. El análisis goeBURST identificó al Complejo Clonal 1 (CC1), compuesto por las ST10, ST23, ST38 y ST130 el cual fue el grupo clonal con mayor distribución.

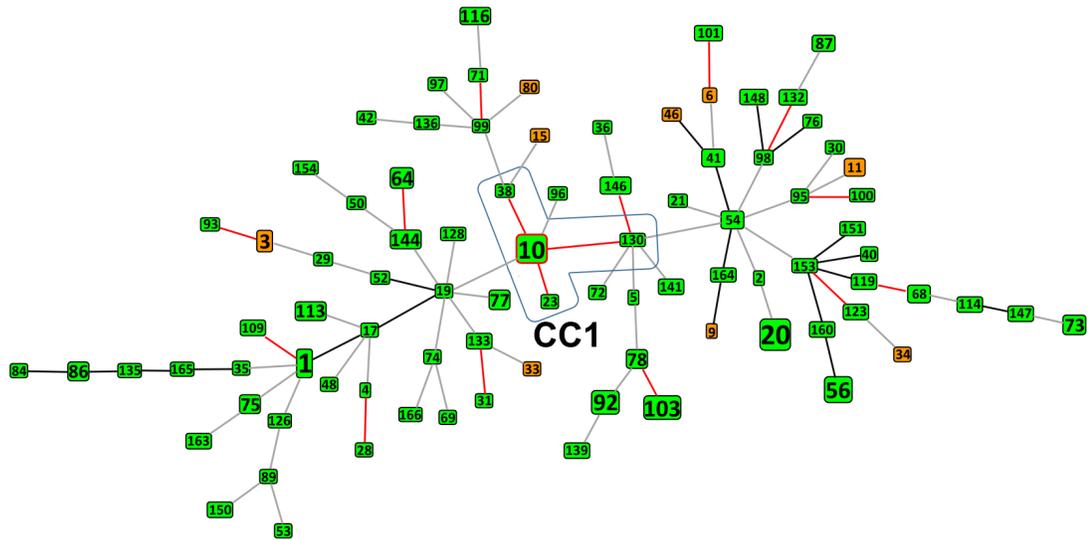


Figura 12. Análisis goeBURST que muestra la distribución de STs predominantes y posibles clonas pandémicas (CC1)

2.8.2. *K. variicola* como un patógeno emergente en humanos

Históricamente, *K. pneumoniae* ha sido la causa principal de una amplia gama de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) e infecciones adquiridas en la comunidad (IAC), con un aumento de la morbilidad y la mortalidad (9). *K. variicola*, así como *K. pneumoniae*, es un patógeno oportunista responsable de infecciones como bacteriemias, infecciones del tracto respiratorio y particularmente se a asociado a infecciones del tracto urinario (ITU) (75;77;78). Las bacteriemias representan un desafío importante en los sistemas de atención de la salud, y la detección oportuna de patógenos es crucial para una terapia antibiótica eficaz (75;79). Entre los miembros del complejo *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* es la principal causa de bacteriemias; sin embargo, los pacientes diagnosticados con una bacteriemia causada por *K.*

variicola tienen una alta tasa de mortalidad en comparación con *K. pneumoniae* (75). *K. variicola* también ha estado ocasionado brotes en neonatos (75;80;81) en los que se ha asociado una alta mortalidad además de que los aislamientos presentan algún tipo de resistencia. Farzana et al., (2018) describieron un brote de sepsis neonatal causada por *K. variicola*; los autores realizaron un estudio integral de los aislamientos que causan sepsis en los recién nacidos y encontraron una mortalidad significativa atribuible a *K. variicola*. Este hallazgo fue corroborado en un modelo de larva (*Galleria mellonella*) en donde se observó una mortalidad del 80% al inocular 10^6 UFC de una de las cepas causantes del brote. Este brote fue causado por una clona multirresistente productora de la BLEE CTX-M-15 y la carbapenemasa NDM-1. No obstante, esta clona poseía genes de virulencia que se encuentran típicamente en cualquier otra cepa de *K. pneumoniae* clásica por lo que no se pudo explicar la mortalidad observada en neonatos, lo que varios autores proponen es que *K. variicola* posee nuevos factores de virulencia aun no descritos (80).

K. variicola también se ha asociado con infecciones en individuos inmunodeprimidos. Berry et al., (2015) describieron un caso de bacteriemia causado por *K. variicola* en una paciente con lupus eritematoso sistémico. La sepsis fatal se atribuyó a *K. variicola* (erróneamente identificada como *K. pneumoniae*). El paciente falleció a pesar de la administración inmediata de antibióticos a los que *K. variicola* era susceptible (82). *K. variicola* y *K. pneumoniae* pueden infectar al mismo paciente (83). Garza-Ramos et al., (2016) describieron un caso en el que un paciente fue infectado por *K. variicola* susceptible y *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa en diferentes intervalos de tiempo. Por otra parte, las infecciones urinarias son causadas principalmente por bacterias Gram-negativas; *K. pneumoniae* es el segundo patógeno más prevalente que causa infecciones urinarias (84). Dado el problema de identificación errónea, *K. variicola* es un patógeno poco reconocido capaz de causar infecciones urinarias. Sin embargo, un estudio retrospectivo realizado en una colección de aislamientos clínicos de *K. variicola* demostró que el 70% (39/56) fueron recuperados de infecciones urinarias. A partir de este hallazgo, los autores demostraron el potencial de algunas cepas para causar infecciones urinarias utilizando un modelo murino de infección de tracto urinario en ratones C3H/HeN y mostraron que *K. variicola* es capaz de establecerse en mayores títulos en la vejiga que *K. pneumoniae*. La uropatogenicidad observada de *K. variicola* se asoció

con proteínas fimbriales propias y la capacidad de expresar diferencialmente genes fimbriales de tipo 1, lo que denota la capacidad de esta especie para adaptarse a nichos específicos (78). En los sistemas de salud, *K. variicola* produce un número menor de infecciones en comparación con las de *K. pneumoniae*; sin embargo, las infecciones causadas por *K. variicola* podrían ser tan graves como las infecciones por *K. pneumoniae* (75;85). Por lo general, las cepas de *K. variicola* muestran tasas de resistencia a los antibióticos más bajas que las de *K. pneumoniae* (5;78;78); sin embargo, este hecho no se asocia necesariamente con una mejor respuesta al tratamiento (82;86). No obstante, la identificación de cepas productoras de carbapenemasa en varias regiones geográficas implica el potencial reservorio de genes de resistencia (4).

2.8.3. Patogenicidad de *K. variicola*

La mayoría de los factores de virulencia encontrados en *K. variicola* corresponden a factores descritos previamente en *K. pneumoniae*. *K. variicola* exhibe cuatro factores de virulencia principales: cápsula, lipopolisacárido (LPS), sideróforos y fimbrias. El primer estudio que analizó los factores de virulencia y determinó la patogenicidad de *K. variicola* se realizó en una cepa obtenida de maíz (*K. variicola* 342). Aunque el objetivo de este estudio fue resaltar las características de *K. variicola* 342 para mejorar el crecimiento y la nutrición de cultivos de maíz, se analizó su posible potencial de virulencia con el objetivo de poder usarla ampliamente en la agricultura como un biofertilizante (87). Para evaluar la patogenicidad de *K. variicola* 342 se implementaron un modelo de neumonía y un modelo de infección de vías urinarias y se comparó con la cepa clínica *K. pneumoniae* C3091. Los resultados mostraron que *K. variicola* 342 era capaz de producir una infección en vías urinarias, comenzando en vejiga y ascendiendo a riñones. En este modelo *K. variicola* 342 fue tan virulenta como *K. pneumoniae* C3091. No obstante, el número de bacterias recuperadas del riñón fue significativamente menor en comparación con *K. pneumoniae* C3091. En el modelo de infección intranasal todos los ratones inoculados con *K. variicola* 342 desarrollaron neumonía, aunque el número de bacterias en los pulmones infectados fue significativamente menor en comparación con *K. pneumoniae* C3091. Estos resultados muestran que *K. variicola* 342 es potencialmente patógena pero menos virulenta que *K. pneumoniae*. Otros estudios realizados con aislamientos clínicos de *K. variicola* han sugerido que *K. variicola* puede ser tan virulenta como las cepas de *K. pneumoniae*

(75;78;85). Long et al., (2017) analizaron la distribución de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* entre 1,777 genomas de aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE, este estudio se llevó a cabo en un sistema de salud de Houston, Texas (Hospital Metodista de Houston). En este estudio, se identificaron 15 /1,777 y 13/1,777 aislamientos de *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*, respectivamente. Entre los pacientes del Hospital Metodista con infecciones causadas por organismos productores de BLEE, *K. pneumoniae*, *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* se asociaron con tipos de infección y desenlaces similares. Es decir, cepas de *K. pneumoniae*, *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* productoras de BLEE causaron una proporción similar de infecciones invasivas (42,5%, 60,0% y 54,5%, respectivamente), al igual que la tasa de mortalidad entre las tres especies fue estadísticamente similar. En este estudio identificaron que *K. variicola* puede ser igual de virulenta que *K. pneumoniae*. En cuanto al viruloma de *K. variicola*, únicamente se identificaron genes de virulencia cromosomales presentes en cualquier cepa de *Klebsiella*, lo que resalta la participación de factores de virulencia nuevo o aun no descritos (85).

En otros trabajos independientes se buscaron genes asociados a virulencia en una colección de genomas de *K. variicola* (85;88;89). Como era de esperar, los genes de virulencia que participan en la biosíntesis de fimbrias tipo 1 y 3 (*fim*, *mrk*), el metabolismo de la urea (*ureA*), la biosíntesis del lipopolisacárido (*wabG*) y los sistemas de captación de hierro. Principalmente los sistemas de hierro enterobactina (*entB*) y *KfuABC* y el receptor del sideróforo aerobactina (*iutA*) se identificaron en todos los genomas; no obstante, no se encontraron genes que codifican las proteínas responsables de la biosíntesis del propio sideróforo (*iucABCD*). Otros genes de virulencia encontrados en algunos genomas fueron los genes para metabolizar la alantoína (*all*), el sideróforo yersiniabactina (*ybtAESTX*) y el receptor del sideróforo salmochelina (*iroN*) (89). Los principales genes de virulencia encontrados en *K. variicola* están localizados cromosómicamente; sin embargo, en las cepas hipervirulentas de *K. variicola* los genes de virulencia se albergan en plásmidos de alto peso molecular, estos genes son lo que se presentan en KpnHV tales como *rmpADC*, aerobactina (*iuc-iutA*) salmochelina (*iro-iroN*), yersiniabactina (*ybt-irp*).

Los hallazgos recientes sobre la uropatogenicidad de *K. variicola* han demostrado un repertorio único de pili (familias Kva y Kvi) que le proporcionan la capacidad de adherirse a células

epiteliales del tracto urinario. Los nuevos pili se encontraron distribuidos entre los distintos clados de *K. variicola* (78). Aunado a esto, la expresión del pili tipo 1 de cepas uropatógenas está controlada por un fenómeno conocido como variación de fase, esto es el cambio reversible entre la expresión de pili de tipo 1 (Fase-ON) y la pérdida de expresión, es decir, células sin pili (Fase-OFF). Este proceso se lleva a cabo en un segmento de DNA invertible llamado *fimS* que contiene el promotor de *fimA*, un gen que codifica para una proteína estructural. Las células en Fase-ON transcriben el gen estructural mientras que este se silencia en las células en Fase-OFF. La orientación del elemento invertible *fimS* está controlada por dos recombinasas específicas del sitio, FimB y FimE. Potter et al., (2018) identificaron algunas cepas de *K. variicola* aisladas de infecciones urinarias que se presentaron en la Fase-ON y acorde con este resultado se encontró que produjeron mayor cantidad de FimA dato medido por inmunoblot (78). Martínez-Romero et al., (2017) también describieron una nueva proteína fimbrial (FimV) que se encuentra en el genoma único de *K. variicola*. FimV se distribuyó en el 90% (28/31) de los genomas de *K. variicola* analizados excepto en tres genomas (BIDMC90, KTE92 y B1). Sin embargo, los autores no investigaron el posible papel sobre la patogenicidad de la bacteria (89). Entre del conjunto de factores de virulencia descritos en *K. pneumoniae*, *K. variicola* únicamente presenta los factores de virulencia clásicos (cápsula, LPS, adhesinas y sideróforos); sin embargo, se ha propuesto que *K. variicola* posee su propio viruloma, el cual no está completamente determinado, como es el caso de los genes de virulencia asociados a UTI que fueron identificados recientemente por Potter et al., (2018) (78). Por otro lado, *K. variicola* se aísla con frecuencia de bacteriemias; sin embargo, no se ha estudiado si existen determinantes que propicien la diseminación de *K. variicola* desde el sitio primario de la infección hacia la sangre. Al igual que el de *K. pneumoniae* y *K. quasipneumoniae*, el genoma de *K. variicola* se considera un genoma abierto, lo que implica que el organismo tiene la capacidad de seguir incorporando genes que le permitan adaptarse a diferentes ambientes, tal como se ha observado en la resistencia a los antibióticos a los que anteriormente era susceptible, así como el potencial de expandir su patogenicidad al incorporar factores de virulencia (30).

2.8.3. El resistoma de *K. variicola*

K. variicola es intrínsecamente resistente a la ampicilina debido a la presencia de la β -lactamasa cromosómica LEN; sin embargo, es susceptible a la mayoría de las clases de antibióticos (4). Este patrón ha cambiado con el tiempo debido a un aumento en el número de cepas de *K. variicola* resistentes a múltiples fármacos (**Figura 14**) (4). Asimismo, los reportes de cepas de *K. variicola* productoras de BLEE y de carbapenemasas han aumentado y algunas de estas cepas se han aislado de nichos ecológicos lo que destaca un papel clave del medio ambiente como reservorio de genes de resistencia a los antimicrobianos (89-91).

El primer caso de *K. variicola* MDR en un entorno clínico se remonta a un brote en un hospital pediátrico que se produjo en 1996 en México. Los aislamientos fueron positivos para BLEE del tipo SHV, para los cuales el gen de la β -lactamasa se localizó en un plásmido conjugativo (81). Posteriormente, se recolectó una cepa productora de la carbapenemasa IMI-2 a partir de una infección de tejidos blandos de un paciente en la unidad de terapia intensiva del Reino Unido. La cepa fue resistente a ertapenem, meropenem e imipenem (CMI \geq 32 mg/L) pero sensible a cefotaxima y ceftazidima (CMI \geq 0.25 mg/L). La carbapenemasa IMI-2 se localizó en un plásmido transferible de la familia IncFIIy y con un tamaño de 77,843 pb; sin embargo, este plásmido no codificó ningún otro gen de resistencia conocido. El análisis *in silico* reveló una alta similitud con otros plásmidos IncFIIy publicados, de los cuales también albergaban un gen carbapenemasa, como las familias de tipo NDM, IMI, IMP o KPC (92).

Long et al., (2017) demostraron que *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola* comparten genes cromosómicos y móviles, que codifican factores de virulencia y genes de resistencia a los antimicrobianos. Se identificaron 9/13 aislamientos productores de BLEE y 3/13 productores de carbapenemasas. Las BLEE identificadas fueron de tipo SHV (principalmente los alelos SHV-5, -12 y -30) y CTX-M-15 y las carbapenemasas identificadas fueron NDM-1 y KPC-2. De igual manera, Liu et al., (2018) analizaron 74 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (KPRC) provenientes de 12 hospitales de Sichuan, China. Mediante la secuenciación del genoma de las KPRC, identificaron 5 aislamientos de *K. variicola* portadores de KPC-2 (4/5) y NDM-5 (1/5) y 2 aislamientos de *K. quasipneumoniae* productores de NDM-1 (85). El análisis de la distribución de genes de resistencia a los antimicrobianos mediante enfoques genómicos ha revelado la presencia de carbapenemasas

que no habían sido descritas anteriormente, tal es el caso de un aislamiento productor de OXA-48 obtenido de un paciente hospitalizado en Noruega (78). Otro estudio realizado por Joo et al., (2018) en el que analizaron muestras fecales de adultos coreanos sanos para evaluar la colonización por enterobacterias patógenas resistentes a antibióticos (93). Se analizaron un total de 1,417 muestras fecales, 4.5% (64/1417) de las cuales se obtuvieron aislamientos de bacterias Gram-negativas, siendo la principal entre ellas (14%, 9/64) *Klebsiella* spp. La distribución de especies dentro de estos aislamientos fue 44.4% (4/9) identificadas como *K. pneumoniae*, 33.3% (3/9) identificadas como *K. oxytoca* y 22.2% (2/9) identificadas como *K. variicola*. Los aislamientos de *K. variicola* mostraron resistencia a colistina (CIM 32 mg/L) sin embargo, la resistencia se debió a un mecanismo cromosomal ya que no identificaron el gen plasmidico *mcr-1*. Posteriormente, Lu et al., (2018) describieron el primer reporte de hipervirulencia asociada con la resistencia a la colistina. La resistencia a colistina fue mediada por una modificación en el sistema de dos componentes (PhoP-PhoQ). Se encontró la sustitución de D150G en PhoP, se sabe que esta mutación media la resistencia a la colistina; sin embargo, este resultado no se corroboró experimentalmente (94).

Con respecto a la resistencia a antimicrobianos en entornos ambientales, Zurfluh et al., (2015) describieron el primer aislamiento de *K. variicola* productores de la carbapenemasa OXA-181, en verduras frescas importadas de Asia a Suiza (91). El gen *bla*_{OXA-181} estaba codificado en un plásmido tipo IncX3 de 51,480 pb. *bla*_{OXA-181} se identificó flanqueado por dos elementos de inserción IS26. La descripción de *K. variicola* productora de NDM-9 en un río urbano de Corea del Sur fue reportada por Di et al., (2017); el gen *bla*_{NDM-9} se localizó flanqueado por las secuencias de inserción IS26 e IS15D1 en un plásmido IncFII de 108-kb; en este plásmido también se identificaron genes de resistencia a mercurio localizados río arriba del gen *bla*_{NDM-9} y flanqueados por las IS26-TnAS3 e IS15 (90). La presencia de otro tipo de carbapenemasas no comunes en *K. variicola* como los son GES-6 y GES-24 fue identificada en muestras de aguas residuales (95). Curiosamente, el contexto genético de estas carbapenemasas se encontró en dos integrones distintos, In1439, que contiene los *bla*_{GES-24-aacA4}, e In1442, que contiene *bla*_{GES-6-aacA4-*bla*_{OXA-17}. Los estudios mencionados anteriormente destacan la existencia de posibles rutas para la diseminación de *K. variicola* productora de carbapenemasas en el medio ambiente ya sea a través de alimentos para el consumo humano}

o el agua. La diseminación de las carbapenemasas se acompaña de otros genes de resistencia a antibióticos usualmente localizados dentro de elementos genéticos móviles altamente transferibles, esto representa la potencial propagación de la resistencia antimicrobiana entre microorganismos estrechamente relacionados.

Por otra parte, los plásmidos juegan un papel importante en la diseminación de los genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos (96). *K. variicola* comparte una distribución similar de plásmidos con los otros miembros del complejo *K. pneumoniae*, lo que sugiere que existe un intercambio de genes a través de mecanismos de transferencia horizontal entre estos miembros y de esta manera se favorece la propagación de genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos. En particular, los replicones de la familia FIBk, FIIk y FII se encontraron principalmente en los aislamientos de *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* (85) (**Figura 13**).

Los estudios genómicos descritos anteriormente han contribuido a comprender la distribución de genes de resistencia a los antimicrobianos en *K. variicola*. La reciente adquisición de genes de resistencia destaca la posibilidad de la transferencia horizontal de genes como el principal mecanismo de adaptación de *K. variicola*. Estos estudios demuestran la importancia de una identificación precisa ya que esta especie bacteriana se está convirtiendo en una preocupación debido a su potencial para adquirir y diseminar genes de resistencia a antibióticos en entornos clínicos y ambientales.

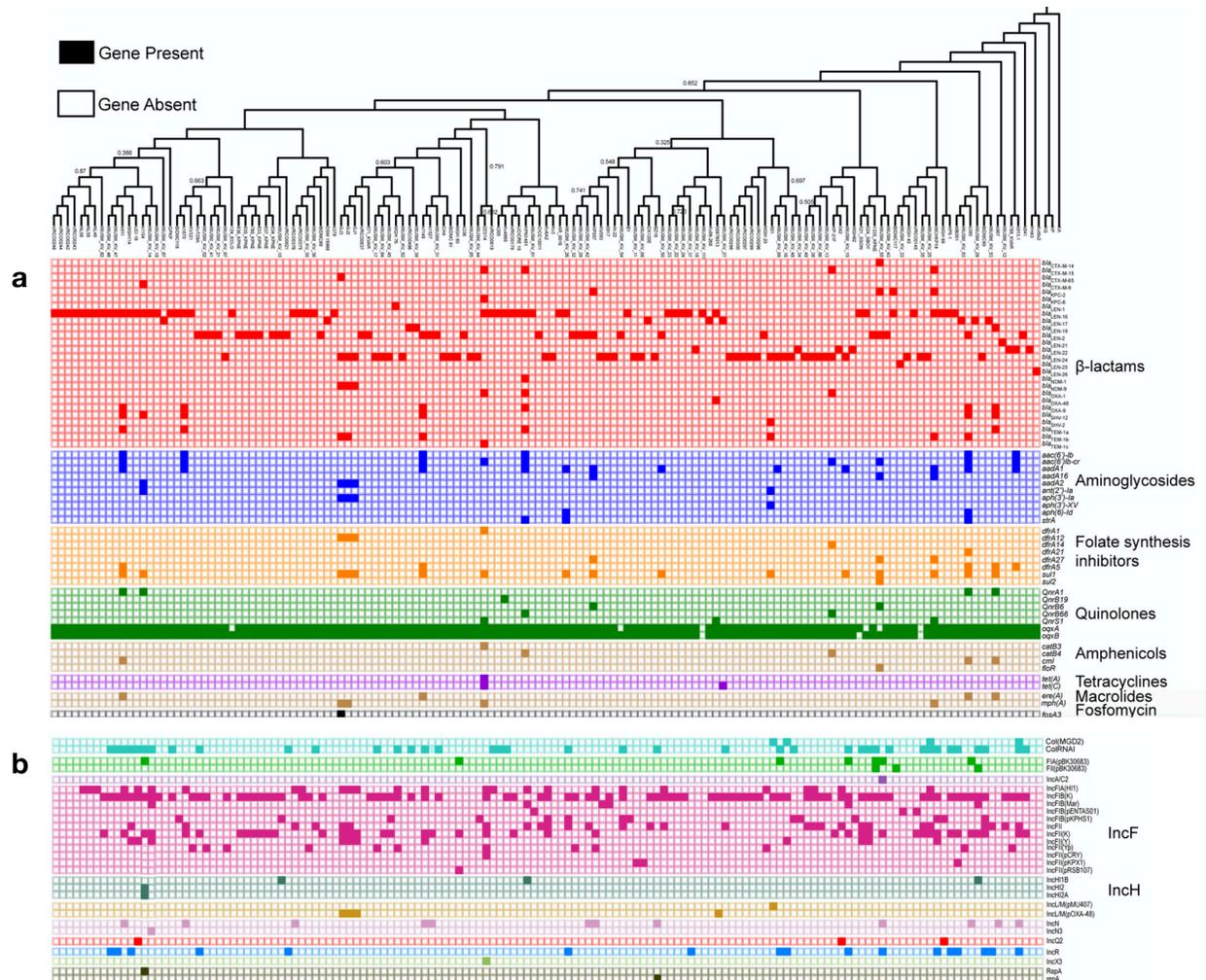


Figura 13. Distribución de genes de resistencia a diferentes familias antibióticos (a) y familias de plásmidos (b) predominantes en 145 genomas de *K. variicola*. Ambas características se representan en una matriz de presencia y ausencia, los cuadros rellenos significan la presencia y los vacíos la ausencia (78).

2.8.4. Genómica poblacional de *K. variicola*

Investigaciones recientes sobre la estructura de la población de *K. variicola* han mostrado dos linajes genómicos (L1 y L2) que no están restringidos por el área geográfica, hospedero o patrones de resistencia a los antimicrobianos (78). L2 está compuesto por el mayor número de genomas (143/145) distribuidos entre 26 clados y dos genomas distantes que forman el L1 (**Figura 14**). Análisis filogenómicos previos han demostrado que *K. variicola* se deriva de un

ancestro común y posee un genoma con una baja frecuencia de eventos de recombinación (85;97); sin embargo, la recombinación entre los miembros del complejo de *K. pneumoniae* ocurre y puede ser impulsada por la amplia diversidad genética dentro de estas especies (78;85). Con el creciente número de nuevos genomas de *K. variicola* en bases de datos públicas, es probable que se observen diferencias en la estructura de la población como nuevos linajes y subespecies, tal es el caso de reciente in de *K. variicola* subs. *tropica* (98).

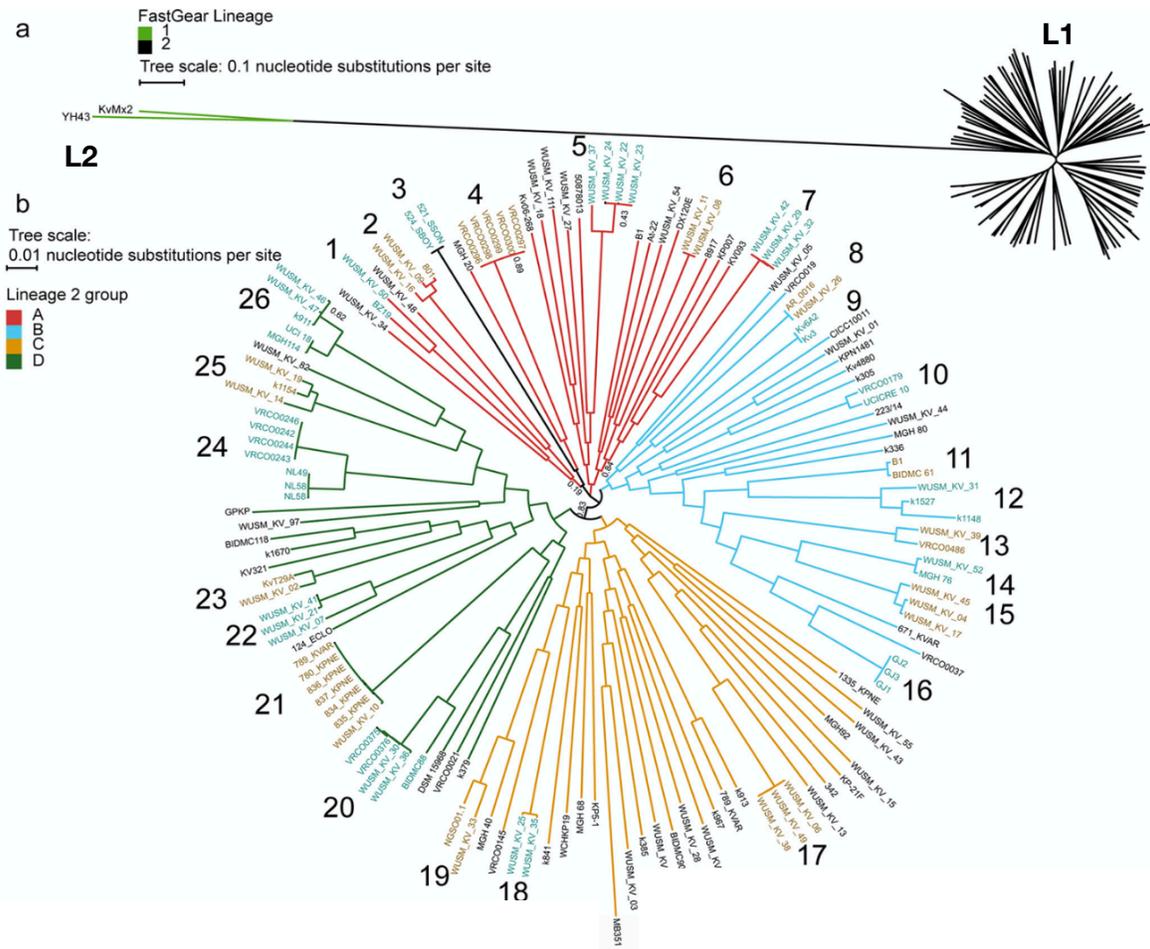


Figura 14. Estructura de la población de *K. variicola*. **a)** Árbol filogenético realizado con el método de máxima verosimilitud de 145 genomas (50 genomas obtenidos del NCBI y el resto corresponden a genomas secuenciados del estudio de Potter et al), se muestran los linajes L1 y L2 de *K. variicola*. **b)** Filogenia basada en SNPs de 145 genomas de *K. variicola*, se muestran los 26 clados que forman la estructura poblacional de *K. variicola*.

2.8.5. Distribución ambiental de *K. variicola*

Además del entorno clínico donde se ha identificado *K. variicola*, esta especie bacteriana también se encuentra en una amplia diversidad de nichos naturales (**Figura 15**). Una de las propiedades particulares que posee *K. variicola* es la capacidad de fijar nitrógeno, esta característica ha resultado en una asociación beneficiosa con la planta ya que promueve su crecimiento. A diferencia de las bacterias rizobiales las cuales nodulan la planta, *K. variicola* es una bacteria de vida libre debido a que no forma estas estructuras dentro de la planta. Diferentes trabajos han mostrado evidencia de que *K. variicola* juega como bacteria promotora de crecimiento a través de mecanismos directos tales como la fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas, en particular la producción de ácido indol-3-acético (IAA), se han examinado ampliamente (4). Por otro lado, la relación mutualista entre colonias de hormigas cortadoras de hojas y hongos fue el primer ejemplo del tipo de relación que puede establecer *K. variicola*. El crecimiento exitoso de la colonia de hormigas cortadoras de hojas está respaldado por la fijación simbiótica de nitrógeno de *K. variicola*, lo que sugiere que las colonias obtienen una proporción sustancial de sus necesidades de nitrógeno de esta asociación bacteriana (99). Asimismo, la cepa *K. variicola* KP5-1 se aisló de la microbiota de chinches verdes del sur (*Nezara viridula*). Es bien conocido el potencial de este insecto como vector de agentes causantes de enfermedades de plantíos de algodón (100). En China, *K. variicola* KV321 se aisló del suelo de la rizosfera de *Pisolithus tinctorius-Eucalyptus*. El aislamiento exhibió una alta capacidad de fijación de nitrógeno y las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos demostraron resistencia a polimixina, penicilina G, tetraciclina y eritromicina (101). El ciclo del nitrógeno y la diversidad de los organismos que llevan a cabo las transformaciones del nitrógeno en los hábitats subterráneos están poco estudiados. Algunas de las muestras bacterianas recogidas de las paredes de las cuevas de lava se identificaron como *K. pneumoniae* fijadora de nitrógeno por la presencia de genes *nifH*. El análisis de las secuencias de *nifH* reveló una identificación errónea de estas cepas, y los resultados mostraron a *K. variicola* como la comunidad bacteriana fijadora de nitrógeno en los hábitats subterráneos (102). Las capacidades potenciales de *K. variicola* para participar o producir enfermedades no se limitan solo a los animales silvestres. La mastitis bovina es la afección en la que el animal presenta síntomas físicos en la ubre, como hinchazón, calor, dureza, enrojecimiento, dolor y la

leche presenta un aspecto acuoso, escamas, coágulos o pus. Las vacas que enferman presentan una disminución en la producción de leche que depende del patógeno específico que causa la infección, donde *K. pneumoniae* es uno de los principales agentes microbianos responsables de la mastitis bovina. En Newfoundland, Canadá, el 4% de los casos de mastitis bovina de 11 granjas se identificaron como causados por *K. variicola*. La patogenicidad de *K. variicola* como agente infeccioso en bovinos está poco estudiada (103), sin embargo en *K. pneumoniae* se ha investigado los determinantes genéticos responsables de la mastitis a través de estudios de asociación de todo el pangenoma (PGWAS, pangenome-wide association study). En estudio compararon aislamientos causantes de mastitis vs. aislamientos colonizadores y encontraron tres genes que estuvieron fuertemente asociados con mastitis. Estos genes fueron *lacI* (codifica un regulador transcripcional), *lacZ* (β -D-galactosidasa) y *lacY* (lactosa permeasa) los cuales forman parte de un operón *lac* adquirido el cual es distinto del operón lactosa conservado en el cromosoma de otros aislamientos de *K. pneumoniae* y *K. variicola*. El operón *lac* adquirido estuvo presente en 18/20 aislamientos de *K. pneumoniae* causante de mastitis clínica, en 8/10 casos de mastitis subclínica y en 3/19 aislamientos fecales bovinos. Este hallazgo sugiere que la utilización de lactosa de la vaca usando este segundo operón de lactosa puede conferir una importante ventaja de crecimiento selectivo a los aislamientos de *K. pneumoniae* asociados con mastitis. Asociaciones similares han sido identificadas para *Streptococcus agalactiae* (97). El operón *lac* adquirido fue identificado en el 50% de los aislamientos de *K. pneumoniae*, en el 60% de aislamientos de *K. quasipneumoniae* y en el 16% de aislamientos de *K. variicola*, sin embargo, no se asoció con infección o tipo de espécimen entre aislamientos humanos. En particular, el operón *lac* adquirido se ubicó adyacente a una copia del operón *fec* enterobactina, que también mostró una asociación positiva con mastitis. Los autores proponen que la combinación de operones *fec* y *lac* probablemente proporciona a *K. pneumoniae* la capacidad de invadir a través de la ubre y prosperar dentro de las células epiteliales mamarias.

Hay pruebas claras de que las plantas son un reservorio natural de *K. variicola* y, en algunos casos, este nicho se comparte con *K. pneumoniae* (105); sin embargo, este aspecto está poco estudiado.

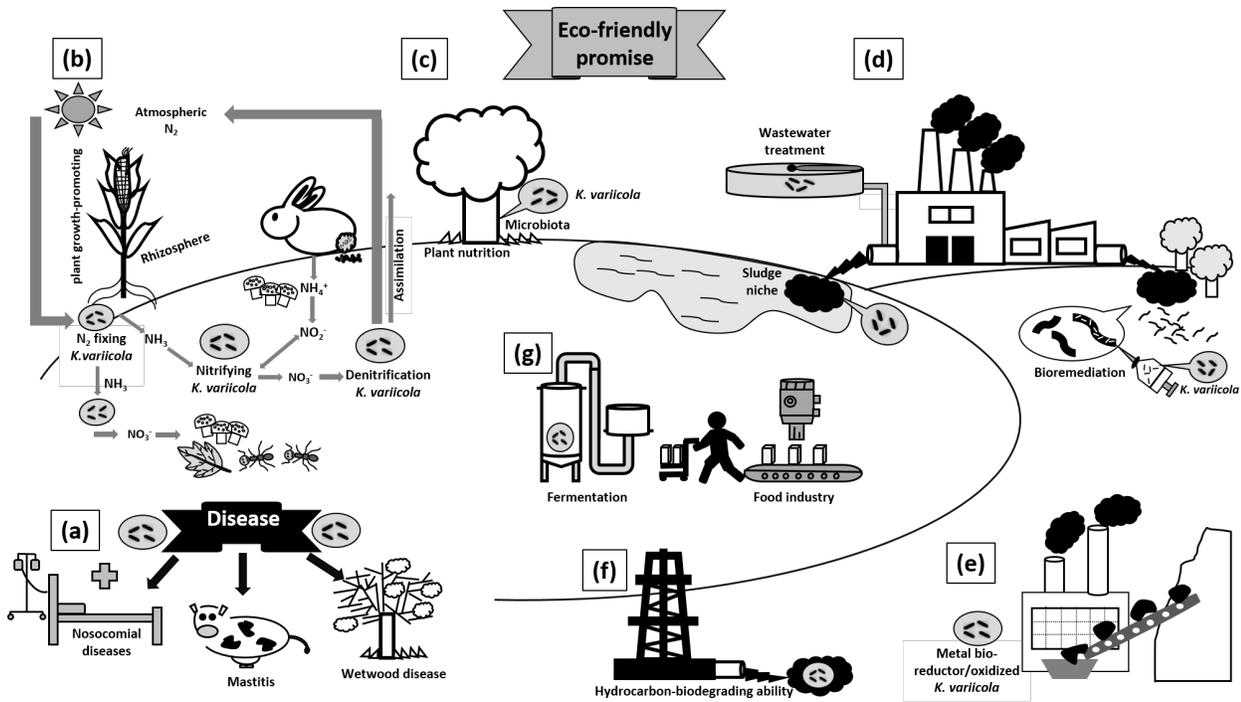


Figura 15. Ecología de *K. variicola*. a) *K. variicola* como patógeno en plantas, animales y humanos. b) Propiedades como fijación y desnitrificación de N_2 . c) Microbiota en plantas y su aporte en la asimilación de N_2 y nutrición vegetal. d) Biorremediación de suelos y aguas contaminados y su participación en el tratamiento de aguas residuales. e) Propiedades bioreductoras / oxidadas de metales. f) Capacidad de biodegradación de hidrocarburos. g) Participación en procesos de fermentación e industria alimentaria y farmacéutica (104) .

Recientemente, se propuso el término “fitonosis” para describir las infecciones humanas causadas por bacterias transmitidas por plantas, en paralelo al término zoonosis para patógenos bacterianos transmitidos por animales. Más tarde, la fitonosis se describió más como un caso de bacterias que cruzan el reino de las plantas a los humanos (106). Este término se utilizó para el aislamiento clínico *K. variicola* X39, que tenía la capacidad de colonizar raíces, tallos y hojas de maíz en un periodo de tiempo corto. Esta capacidad dual (infecciones humanas y colonización de plantas) de *K. variicola* se determinó previamente mediante ensayos *in vitro* de los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas, que se compartieron entre los aislamientos de plantas y humanos (89). Hoy en día, *K. variicola* puede considerarse una especie bacteriana que puede infectar a los humanos como patógeno y colonizar las plantas como endófito y en pocos casos como fitopatógeno.

2.8.6. Fenotipos de *K. variicola*: clásica, hipervirulenta e hipermucoviscosa

2.8.6.1 *K. variicola* clásica

K. variicola se identificó por primera vez en entornos ambientales y clínicos. Como se mencionó anteriormente, las cepas de *K. variicola* son ampliamente susceptibles a los antimicrobianos; sin embargo, han aumentado los reportes de *K. variicola* productora de BLEEs y de carbapenemasas. A diferencia de la variante de *K. pneumoniae* clásica la cual es típicamente multirresistente, la variante *K. variicola* clásica (KvaC) agrupa aislamientos susceptibles y multirresistentes a los antibióticos, siendo la susceptibilidad un rasgo característico de *K. variicola*. Los aislamientos de KvaC contienen factores de virulencia compartidos con *K. pneumoniae*; sin embargo, se ha demostrado que la KvaC es patógena particularmente en infecciones de vías urinarias y bacteriemias, lo que podría indicar factores de virulencia aun no descubiertos (4). En la Tabla 1 se mencionan las clonas clínicamente importantes que exhiben resistencia a múltiples fármacos. Esta variante se ha descrito detalladamente en las secciones anteriores por lo que en este apartado se discutirá los otros dos fenotipos que puede presentar *K. variicola*.

2.8.6.2 *K. variicola* hipervirulenta

Hasta el momento existen tres reportes de *K. variicola* hipervirulenta (KvaHV) (**Tabla 1**). El primer reporte (R1) corresponde a una cepa resistente a colistina (WCHKV030666), la cual fue obtenida de una muestra de hemocultivo de un paciente hospitalizado en China (107). El análisis genómico reveló la presencia de un plásmido grande, pVir_030666 (236-kb), en el que se identificaron múltiples genes de virulencia que se encuentran comúnmente en las cepas de KpnHV. Entre ellos, los genes codificados en plásmidos fueron los reguladores del fenotipo mucoide *rmpADC* y *rmpA2*, los sideróforos aerobactina, salmochelina y yersiniabactina. Comúnmente, el sideróforo yersiniabactina se localiza en el cromosoma de *Klebsiella* (107;108); sin embargo, en este caso, el sideróforo se encontró en el pVir_030666. Curiosamente, la cepa WCHKV030666 carecía del fenotipo hmv, este hecho se lo atribuyeron a una mutación con cambio en el marco de lectura del gen *rmpA2*; sin embargo, el papel del operón *rmpADC* en

este fondo genético no está claro. Al comparar la secuencia del plásmido pVir_030666 con pLVPK (109), uno de los plásmidos de virulencia mejor estudiados en KpnHV sugirió que pVir_030666 portaba más genes de virulencia debido a diferencias en la estructura y tamaño del plásmido. Como los plásmidos de virulencia, pVir_030666 no es autoconjugativo; no obstante, se identificó un sistema de conjugación incompleto junto con la presencia de la IS3 en el gen *traG*, estos defectos se asociado con la incapacidad de autotransferirse (94).

El segundo reporte de *K. variicola* hipervirulenta (R2) correspondió a un clona multirresistente (MDR) que causó un brote en neonatos con alta mortalidad asociada (80) (Tabla 1).

Tabla 1. Características fenotípicas y genéticas de las variantes de *K. variicola* y *K. pneumoniae*

Bacterial species	Phenotype ^a	Parameter								
		Types of infection	Susceptible population	Primary acquired infection type	Virulence factors ^b	Antibiotic resistance phenotype	String test ^c	Capsule (KL) ^d	Sequence type (ST) ^e	AMR genes associated with ST
<i>K. pneumoniae</i>	cKpn	Bacteremia, UTI, pneumonia, meningitis	Immunosuppressed	HAI	Capsule, LPS, fimbriae type 3 and 1, <i>ybt</i> , <i>kfu</i> (all)	Multidrug-resistant	Negative	KL1 to KL134	ST258 ST512 ST11 ST340 ST437	KPC-2
	hmvKpn	Bacteremia and invasive syndromes	Immunosuppressed	HAI	Capsule, LPS, fimbriae type 3 and 1, <i>ent</i> (all), <i>ybt</i>	Susceptible and multidrug resistant	Positive	KL1 to KL134	ST1007 ST1022 and twenty-three different ST	ESBL-producers and quinolone resistance
	hvKpn	Pyogenic liver abscess; bacteremia; lung, neck, and kidney abscesses; pneumonia; cellulitis; necrotizing fasciitis; myositis; meningitis; endophthalmitis	Healthy and immunosuppressed	CAI	<i>plucA</i> , <i>piroB</i> , <i>peg-344</i> , <i>prmpA</i> , and <i>prmpA2</i>	Mostly susceptible and less frequently multidrug-resistant	Positive	KL1, KL2 and KL54	ST23 ST86 ST375 ST380	KPC-2 CTX-M-3
<i>K. variicola</i>	cKv	Bacteremia, UTI, pneumonia	Immunosuppressed	HAI and CAI	Capsule, LPS, fimbriae type 3 and 1, <i>kva</i> , <i>kvi</i> , <i>fimV</i> , <i>ybt</i> , <i>ent</i> (all), <i>kfu</i> (all)	Susceptible and multidrug resistant	Negative	KL3 to KL134	ST906 ST981 ST363 ST1142 ST1708	CTX-M-15/NDM-1 OXA-48 NDM-9 CTXM-15/KPC-2 KPC-2
	hmvKv	Pneumonia	Immunosuppressed	HAI	Capsule, LPS, fimbriae type 3 and 1, <i>fimV</i> , <i>ent</i> (all), <i>kfu</i> (all)	Susceptible	Positive	KL114	ST3920	Negative
	hvKv	Bacteremia	Immunosuppressed	HAI	R1. <i>plucA</i> , <i>piroB</i> , <i>ybt</i> , <i>ent</i> (all), <i>prmpA</i> , and <i>prmpA2</i>	Susceptible to most antibiotic classes except for colistin	Negative	KL16	ST595	D150G in PhoP
		lesions and epidural haematoma caused by trauma	?	CAI	R2. Capsule, LPS, fimbriae type 3 and 1, <i>ent</i> (all), <i>kfu</i> (all)	Multidrug-resistant	Negative	Novel KL	ST771	CTX-M-15 NDM-1
				R3. <i>plucA</i> , <i>piroB</i> , <i>prmpA</i> , and <i>prmpA2</i> ,	Multidrug-resistant	Positive	KL16	ST595	KPC-2	

^acKpn, classical *K. pneumoniae*; hmvKpn, hypermucoviscous *K. pneumoniae*; hvKpn, hypervirulent *K. pneumoniae*; cKv, classical *K. variicola*; hmvKv, hypermucoviscous *K. variicola*; hvKv, hypervirulent *K. variicola*.

^bBold characters refers to new fimbrial type 1 systems; all, means identified the entire population of isolates analyzed. R1: refers to hypervirulent *K. variicola* colistin resistant and R2: refers to hypervirulent *K. variicola* responsible for causing an outbreak; *p*, refers to plasmid localization of virulence factor

^cPositive string test define hypermucoviscous strains.

^dCapsule type determined by using *K. pneumoniae* capsule typing scheme.

^eST was determined by using MLST *K. pneumoniae* scheme. In the case of classic *K. variicola* and *K. pneumoniae* the STs refers to clinically important AMR clones.

A diferencia de la cepa descrita en el trabajo de Lu et al., (2018) (93), la clona del brote poseía solo factores de virulencia clásicos, como sistemas de adquisición de hierro, genes para la biosíntesis de fimbrias y ureasa pero carecía de los genes *rmpADC* y *rmpA2*. Se evaluó la patogenicidad *in vivo* de *K. variicola* usando el modelo de larva *Galleria mellonella* y se comparó con la cepa KpnHV A58300 (ST23). Los resultados sugirieron que *K. variicola* era más patógena que KpnHV A58300. En este caso, la hipervirulencia pudo haber sido impulsada por nuevos determinantes de virulencia distintos de los comúnmente encontrados en las cepas de KpnHV. Además, se identificó la presencia de la carbapenemasa NDM-1 y la BLEE CTX-M-15, lo que concuerda con la convergencia de la resistencia a múltiples fármacos y la hipervirulencia. Además, los autores encontraron inconsistencias a la hora de determinar el tipo capsular, lo que sugiere un nuevo locus KL con respecto a los serotipos de *K. pneumoniae* descritos.

Finalmente, el tercer reporte (R3) corresponde a la descripción de un aislamiento obtenido de una muestra de esputo de una paciente hospitalizada en la provincia de Zhejiang, China, esta cepa (15WZ-82) fue resistente a todos los betalactámicos pero susceptible a amikacina, polymixina B, ciprofloxacino y tigeciclina (69). Al analizar la secuencia de su genoma se identificó un plásmido de virulencia muy similar al pLVPK, denominado p15WZ-82_Vir en el que se encontraron *rmpA*, *rmpA2*, salmochelina (*iroBCDN*) y aerobactina (*iucABCD- iutA*), además se identificó el sistema de resistencia a telurio. Estos factores de virulencia estuvieron distribuidos en un fragmento de 100 kb flanqueado por secuencias de inserción. Un dato interesante, fue que las regiones fuera del fragmento de 100 kb presentaron una alta similitud (68% cobertura y 99% identidad) con un plásmido de la cepa KSB1_10J de *K. pneumoniae*; en este fragmento se identificaron todos los genes del operón *tra*, el cual es responsable de la transferencia y movilización del plásmido p15WZ-82_Vir, por lo que esta es la primera descripción de un plásmido de virulencia autotransferible en el género *Klebsiella*. El surgimiento de este nuevo plásmido se atribuye a procesos de recombinación homóloga entre el fragmento de 100 kb del pLVPK y un fragmento del plásmido conjugativo de la cepa KSB1_10J. El nivel de virulencia de la cepa KvaHV 15WZ-82 fue evaluada tanto en modelo de larva *G. mellonella* como en ratón y ambos modelos se pudo evidenciar una elevada mortalidad (80% a las 120 h) muy similar a la exhibida por una cepa KpnHV. Dado que el plásmido p15WZ-82_Vir tenía la capacidad de conjugarse, evaluaron la frecuencia de conjugación en *E. coli* EC600 y en cepas

de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos y con diferentes STs entre ellas la ST11, ST307 y ST101. Los datos obtenidos de este experimento mostraron que la cepa 14WZ-24-TC (ST11) presentó una mayor frecuencia de conjugación (10^{-2} UFC) a diferencia de las demás en las que la tasa de conjugación disminuyó drásticamente. La adquisición del plásmido p15WZ-82_Vir trae como consecuencia un aumento en la virulencia de la cepa transconjugante (14WZ-24-TC) ya que al evaluar en modelo murino mostró el 100% de mortalidad, es claro que el fondo genético de *K. pneumoniae* puede intervenir en el aumento de la virulencia.

2.8.5.3 *K. variicola* hipermucoviscosa

El fenotipo hipermucoviscoso (hmv) se describió por primera vez en KpnHV ST23. En el 2015 se describió el primer aislamiento de *K. variicola* hmv (KvaHVM) obtenido de un paciente hospitalizado (5). El aislamiento *K. variicola* 8917 contenía factores de virulencia clásicos, entre ellos sideróforos, sistemas de captación de hierro, fimbrias y adhesinas (**Tabla 1**). El tipo capsular de *K. variicola* 8917 se determinó como KL114, aunque previamente se había realizado mediante el esquema de tipificación por *wzc* y basado en este esquema se identificó el alelo *wzc*-932. El ST2 se determinó utilizando un esquema de tipificación de secuencia multilocus (MLST) de *K. variicola* (75). Pudimos identificar que el aislamiento de *K. variicola* 8917 llevaba un plásmido de ~200-kb al que nombramos pKV8917, en el que no se identificaron genes de resistencia a antibióticos. Sin embargo, pKV8917 alberga los genes de resistencia al telurio *terZABCDE-terW* (operón *ter*), que están asociados con KpnHV(110). Sin embargo, el operón *rmpADC* y el gen *rmpA2* asociados con el fenotipo hmv en KpnHV estaban ausentes, por lo que resalta la presencia de un mecanismo nuevo involucrado en la hmv en otra especie distinta de *K. pneumoniae*. Con base a los antecedentes antes descritos nos planteamos la siguiente pregunta de investigación y objetivos en la presente tesis.

3. Preguntas de Investigación

1. ¿Cuáles son los genes candidatos de la hipermucoviscosidad de *K. variicola* 8917?
2. ¿Los genes hmv se encuentran en plásmido o en cromosoma?
3. ¿La hipermucoviscosidad aporta a la virulencia al aislamiento *K. variicola* 8917?

4. Objetivo General

- Identificar los genes candidatos responsables de la hipermucoviscosidad de *K. variicola* 8917
- Analizar el papel de la hipermucoviscosidad sobre la virulencia de *K. variicola* 8917

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de transferencia del plásmido pKV8917 a otras cepas no hmv
- Evaluar los efectos de la eliminación y adquisición del plásmido pKV8917 sobre fenotipos de virulencia
- Analizar la estructura genómica del plásmido pKV8917
- Comparar la estructura del plásmido pKV8917 con otros plásmidos reportados

5. Materiales y métodos

5.1 Identificación de aislamientos bacterianos

El aislamiento clínico *Klebsiella variicola* 8917 y una primera versión de su genoma se describió en el trabajo de Garza-Ramos et al., (2015) (5). Brevemente, el aislamiento se obtuvo del esputo de un paciente de la tercera edad del Hospital Regional Centenario de la Revolución Mexicana en Morelos, México, en 2011.

5.2 Ensayos de conjugación, inducción *in vitro* de mutantes de *Klebsiella variicola* resistentes al ácido nalidíxico y estabilidad del plásmido

Se utilizaron como cepas receptoras a *K. variicola* F2R9 y *Escherichia coli* J53-2 resistente a rifampicina, ambas cepas son no hmv. Debido a que *K. variicola* F2R9 es susceptible a todas las familias de antibióticos (excepto ampicilina) se indujo de manera *in vitro* la resistencia a ácido nalidíxico, para tener un marcador de co-selección. Para generar la mutantes resistentes a ácido nalidíxico se partió de un cultivo de 5 ml saturado y se diluyó 1:1000 en un tubo con LB fresco adicionado con 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido nalidíxico se incubó a 37°C con agitación toda la noche; al día siguiente se tomaron 200 μl y se inoculó un tubo con 5 ml de LB fresco adicionado con 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido nalidíxico, los días subsecuentes se realizó el mismo procedimiento incrementando la concentración de ácido nalidíxico hasta lograr un crecimiento en 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Finalmente, la bacteria que creció en 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ se consideró una mutante inducida, y esta mutante se utilizó como receptora para los experimentos de conjugación. Los experimentos de conjugación se realizaron en medio líquido. Las cepas donante y receptora se crecieron hasta la fase logarítmica [densidad óptica (DO) de aproximadamente 0.6] a 37°C con agitación. A continuación, se mezclaron 200 μl de células del donante y 800 μl de células receptoras, se colocaron en un tubo nuevo y luego se incubaron a 33°C durante la noche. Después de la incubación, se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon. Las transconjugantes se seleccionaron en placas de agar LB que contenían 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de rifampicina y 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ telurito de potasio (K_2TeO_3) para las transconjugantes de *E. coli* J53-2, y para las transconjugantes de *K. variicola* F2R9, las placas contenían 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nalidíxico ácido y 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de K_2TeO_3 .

Tabla 2. Secuencia de los pares de oligonucleótidos utilizados en este estudio y tamaño del producto amplificado.

Secuencia (5'-3')	Anneling (°C)	Gen	Tamaño del producto (bp)	Referencia
terW-F (TACACCCTGGCTAACATACT) terW-R (TTTTTCTACTGCCTCGCTTC)	58	<i>TerW</i>	367	Este estudio
940003-F (TGGTTCACTGATGGTAGCCG) 940003-R (CGGGTTTTTCAGCGTGAAGG)	60	<i>FruA</i>	763	Este estudio
940016-F (ATGAATACCTCCGGCGAGGA) 940016-R (AACTGGTCGGTAAACACCCG)	60	<i>ScrK</i>	776	Este estudio
ERIC1R (CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA) ERIC2 (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG)	52	NA	NA	12
<i>leuSKv</i> -F (CGAACAGGTTATCGACGGCT) <i>leuSKv</i> -R (CAAAGGTGTCGGTTTCACGC)	63	<i>LeuS</i>	968	21
<i>pgiKv</i> -F(AAAGAGACCGATCTGGCAGG) <i>pgiKv</i> -R (ACCAGATACCGATCAGCGCC)	60	<i>Pgi</i>	760	21
<i>pyrGKv</i> -F (CCGATCGCTATGGTCGCTG) <i>pyrGKv</i> -R (CGGGACATCAGTTCCGGGT)	60	<i>PyrG</i>	664	21

Se realizó el ERIC-PCR (**Tabla 2 y Tabla 4**) el cual amplifica secuencias repetidas en los cromosomas bacterianos para dar una “huella genética” y establecer relaciones de parentesco (Versalovic et al., 1991). Se confirmó que las transconjugantes presentaran el mismo perfil ERIC que el de las cepas parentales. Además de la amplificación de las secuencias repetidas, seleccionamos tres genes del esquema de tipificación de secuencias multilocus de *K. variicola* (Barrios-Camacho et al., 2019) que pudieran diferenciar a *K. variicola* F2R9 de *K. variicola* 8917. Los genes *leuS*, *pgi* y *pyrG* se seleccionaron para la amplificación por PCR (**Tabla 2**) y su posterior secuenciación por el método de Sanger (**Tabla 3**). Posteriormente se realizó un análisis filogenético de la secuencia concatenada de estos tres genes con el fin de corroborar la relación entre las cepas parentales y transconjugantes. Para confirmar la adquisición del plásmido, se amplificaron los marcadores plasmídicos *terW*, *fruA* y *scrK* por PCR, y se realizó la determinación del perfil plasmídico según el método de lisis alcalina descrito por Kieser et al., (1984) (111). La cepa de *E. coli* NCTC 50192, que contiene los plásmidos de 154, 66, 48 y 7 kb, se utilizó como marcador de peso molecular. La eficiencia de conjugación se calculó como el número de transconjugantes por UFC de receptoras. Se confirmó la auxotrofia de las transconjugantes de *E. coli* J53-2 a prolina y metionina y la presencia de genes de plásmido. La estabilidad del plásmido se determinó mediante pases sucesivos sin telurito de potasio y la

amplificación de marcadores de plásmido y extracción de plásmido usando lisis alcalina como se menciona en la sección 5.3.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para los genes *terW*, *fruA*, *scrK*, *leuS*, *pgi* y *pyrG*

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo	No. de ciclos
Entrada	95 °C	5 minutos	
Desnaturalización	95 °C	1 minuto	
Alineamiento	*	30 segundos	30
Extensión	72 °C	7 minutos	
Salida	72 °C	1 minutos	

*Temperatura de alineamiento para cada gen se menciona en la Tabla 3.

Tabla 4. Condiciones de amplificación por PCR del DNA genómico de las cepas incluidas en este utilizando los oligonucleótidos ERIC1R y ERIC2.

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo	No. de ciclos
Entrada	95 °C	3 minutos	
Desnaturalización	93 °C	45 segundos	
Alineamiento	50 °C	1 minuto	30
Extensión	65 °C	8 minutos	
Salida	65 °C	16 minutos	

La visualización de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X con excepción los productos obtenidos por el ERIC-PCR, estos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 5. Perfil alélico MLST de los aislamientos de *K. variicola* 8917 y F2R9.

Cepa	Tipo	Perfil Alelico						
		<i>leuS</i> ^a	<i>pgi</i> ^a	<i>pgk</i>	<i>phoE</i>	<i>pyrG</i> ^a	<i>rpoB</i>	<i>fusA</i>
8917	Parental	1	2	2	1	2	1	2
F2R9	Parental	4	7	5	1	10	1	4
F2R9_TC5	Transconjugante	4	7	ND	ND	10	ND	ND
F2R9_TC14	Transconjugante	4	7	ND	ND	10	ND	ND

El perfil alélico fue consultado en la base de datos MLST de *K. variicola* (<http://mlstkv.insp.mx>).

^aEstos genes se seleccionaron para la amplificación, secuenciación y análisis por PCR mediante el método de agrupación de grupos vecinos (Neighbor Joining), véase la figura complementaria S2. Las secuencias de estos genes se cargaron en <http://mlstkv.insp.mx> y se consultó el alelo correspondiente (números en negrita).

5.3 Extracción de plásmidos mediante lisis alcalina

1. Inocular 5 ml de medio LB con las cepas de interés y crecer toda la noche con agitación a 37°C.
 2. Colocar los tubos en hielo durante 20 minutos.
 3. Centrifugar a 4°C/ 13000 rpm para obtener la pastilla de los 5 ml de LB inoculados.
 4. Disolver la pastilla en 400 µl de la solución I (**Tabla 6**) y vortexear.
 5. Adicionar 100 µl de lisozima 10 mg/ml e incubar en hielo durante 30 min.
 6. Adicionar cuidadosamente 250 µl de la solución II (Tabla 5), mezclar por inmersión e incubar a 50 °C por 20 minutos.
 7. Dejar enfriar los tubos 5 minutos a temperatura ambiente.
 8. Adicionar 80 µl de fenol-cloroformo y vortexear durante 1 minuto hasta que la mezcla se torne lechosa.
 9. Centrifugar 30 minutos a 4 °C/13,000 rpm y recuperar el sobrenadante (aprox. 350 µl).
- Para visualizar los plásmidos se preparo un gel de agarosa al 0.7% con buffer TBE 0.5X y se corrió a 80 volts durante 6 horas.

Tabla 6. Composición de las soluciones I y II para la extracción de plásmidos por el método de Kieser (110).

Solución I	Solución II
Sacarosa 1M	SDS al 10% (2)
Tris-HCl 1M pH 8	NaOH 5M (3)
EDTA 0.5M pH 8	Agua destilada (1)
Agua destilada	

*Los números entre paréntesis indican el orden que se debe seguir al adicionar cada reactivo de la solución II

Adicional al protocolo descrito anteriormente, implementamos otro protocolo de extracción:

1. Crecer las cepas en medio líquido toda la noche.
2. Obtener la pastilla de 2 - 5 ml y remover el sobrenadante.
3. Resuspender la pastilla en 100 μ l en el buffer de resuspension (50 mM glucosa/10 mM EDTA/10 mM Tris- Cl, pH 8.0).
4. Adicionar 200 μ l de la solution de lisis (0.2 M NaOH/1% sodium dodecyl sulfate [SDS]). Mezclar por inversión e incubar 5 a temperatura ambiente.
5. Adicionar 150 μ l de acetato de amonio 7.5 M y 150 μ l de cloroformo. Mezclar por inversión. Colocar los tubos en hielo durante 10 minutos. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad.
6. Transferir el sobrenadante a 200 μ l de la solution de precipitación (30% polyethylene glycol 8000/1.5 M NaCl). Mezclar por inversión. Colocar los tubos en hielo durante 15 minutos
7. Centrifugar para obtener la pastilla de DNA. Remover sobrenadante. Finalmente resuspender en buffer TE o agua miliQ.

Notas adicionales al protocolo:

Paso 4. Consiste en lisar las células y desnaturalizar el DNA. La solución de lisis debe prepararse preferentemente al momento.

Paso 5. el cloroformo debe ser adicionado inmediatamente después del acetato de amonio.

5.4 Curación de plásmidos

El curado del plásmido pKV8917 se realizó implementado el método químico descrito por El-Mansi et al., (2000) (112). Se preparó una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS; 10% p/v, pH 7,4) y se adicionó a medio LB 2X para dar concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5% de SDS. Se inoculó 100 μ l de un precultivo y se añadió a los tubos que contenían las diferentes concentraciones de SDS. Posteriormente, los tubos se incubaron a 27°C a 80 rpm. Se seleccionó la concentración más alta en la que hubo crecimiento y se obtuvieron colonias separadas plaqueando 100 μ l de las células en agar LB. Posteriormente, las colonias separadas se replicaron en paralelo utilizando terciopelo en agar LB y agar LB con telurito de potasio (16 μ g ml⁻¹). Las colonias que no pudieron crecer en LB suplementadas con telurito de potasio se consideraron como posibles células libres de plásmidos (cepa curada) (**Figura 16**). Las células libres de plásmidos se confirmaron analizando el perfil del plásmido, la amplificación de los genes *terW*, *fruA* y *scrK* y ERIC-PCR para confirmar la relación genética de la cepa curada y la cepa parental.

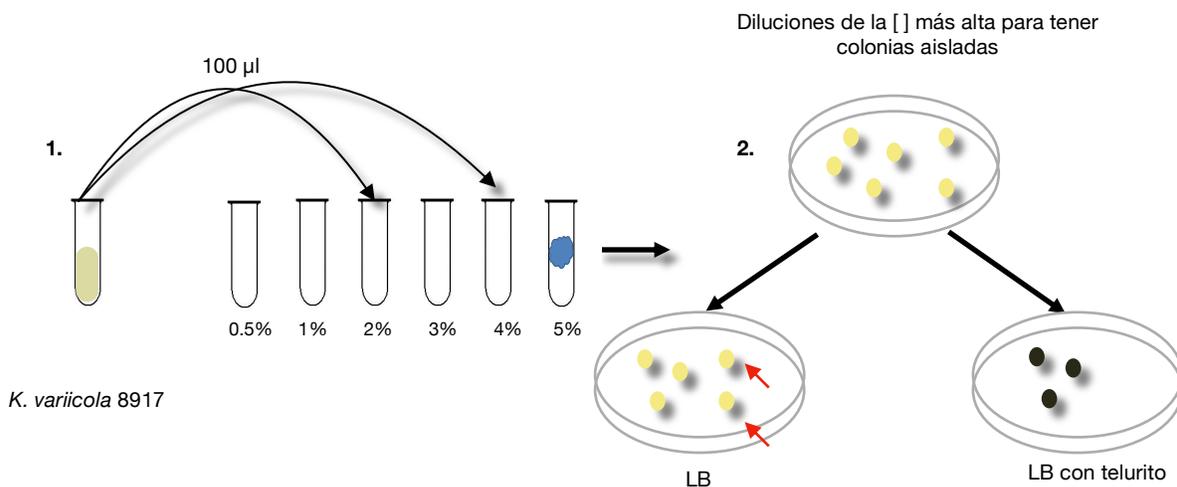


Figura 16. Representación esquemática del procedimiento realizado para la curación del plásmido pKV8917. 1) Inoculación de tubos a diferentes concentraciones de SDS con la cepa *K. variicola* 8917. Se selecciona la concentración más alta a la que se observó crecimiento, usualmente el crecimiento bacteriano se observa como grumos. 2) De la concentración seleccionada se hacen diluciones para obtener colonias aisladas y a partir de aquí

se replican en paralelo tanto en agar LB como en agar LB con telurito. Las colonias crecidas en telurito crecerán negras. Las flechas rojas indican las posibles colonias curadas las cuales se verificaran la presencia o no de los marcadores plasmídicos.

Las células libres de plásmido se cultivaron en agar MacConkey para evaluar el fenotipo hipermucoviscoso mediante la prueba de filamento y el ensayo de mucoviscosidad.

5.5 Ensayo de mucoviscosidad

Además de la prueba cualitativa (prueba de filamento), se evaluó el grado de sedimentación de acuerdo con Bachman et al., (2015) (113). Brevemente, se obtuvo la pastilla de un cultivo de toda la noche. La pastilla se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X) y se ajustó hasta una DO 600 de ~1. Las suspensiones se centrifugaron durante 5 min a 1000 x g y se midió la DO600 de los sobrenadantes. Las lecturas finales se normalizaron a la DO600 del cultivo de tipo parental antes de la centrifugación. Los resultados se presentan como la desviación estándar y media de los datos de tres experimentos independientes. Las cepas *K. variicola* F2R9 y *E. coli* J53-2 se utilizaron como control negativo para comparar a *K. variicola* 8917 y *K. variicola* F2R9_TC(5/14) y *E. coli* J53-2_TC(5/7) respectivamente; como control control positivo, se utilizó la cepa *K. pneumoniae* 10271 *rmpA*⁺/KL2 (114).

5.6 Extracción y cuantificación de cápsula

El contenido de ácido urónicos (AU) se extrajo y se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico, como se describió previamente (115). Brevemente, se mezclaron 500 µl del cultivo bacteriano con 100 µl del detergente zwittergent al 1% en ácido cítrico 100 mM. Luego, las mezclas se incubaron a 50°C durante 20 min y se centrifugaron 5 min a 8000 x g; los polisacáridos capsulares (CPS) se precipitaron añadiendo 1 ml de etanol absoluto a 250 µl de sobrenadantes. Los precipitados se disolvieron en 200 µl de agua y luego se añadieron 1200 µl de bórax 12.5 mM concentrado en H₂SO₄. Las mezclas se agitaron vigorosamente, se hirvieron durante 5 min y se enfriaron. Se añadieron a la mezcla 20 µl de 3-hidroxidifenol al 0.15% en una solución de NaOH al 0,5% y se midió la absorbancia a 520 nm. El contenido de AU se determinó a partir de una curva estándar de AU y se expresó en µg/10⁹ UFC.

5.7 Ensayo de resistencia a la fagocitosis

El ensayo de fagocitosis se realizó como se describe en el trabajo realizado por Ares et al., (2016) (54). Brevemente, se sembraron monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202) (diferenciados en macrófagos con 12-miristato 13-acetato de forbol 200 nM durante 24 h; 6×10^5) en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos. Las bacterias se cultivaron en 5 ml de LB hasta la fase exponencial. Los macrófagos se infectaron con una multiplicidad de infección de 100 en un volumen final de 1 ml de medio de RPM suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%. Para sincronizar la infección, las placas se centrifugaron a $2000 \times g$ durante 5 min. Las placas se incubaron a 37°C bajo una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. Después de 2 h, las células se enjuagaron tres veces con PBS y se incubaron durante 60 min más con 1 ml de RPM que contenía suero bovino fetal al 10% y gentamicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) para eliminar las bacterias extracelulares. Después, las células se enjuagaron de nuevo tres veces con PBS y se lisaron con Triton X-100 al 0.1%. Después de la homogeneización, se sembraron diluciones en serie de 10 veces en placas de agar LB para determinar las UFC totales.

5.8 Ensayo de resistencia a suero humano

Se obtuvo sangre humana de individuos sanos y la resistencia a suero humano se realizó como se describió previamente (116;117). Se mezcló un inóculo de 25 μl de suspensión bacteriana (10^6 UFC) preparado a partir de la fase logarítmica media con 75 μl de un pool de sueros humano. Los recuentos viables se comprobaron a las 0, 1, 2 y 3 h después de la incubación a 37°C. Cada cepa se analizó tres veces y los resultados medios se expresaron como porcentaje del inóculo superviviente. La respuesta a la muerte del suero en términos de recuentos viables se puntuó utilizando seis grados clasificados como sensibles al suero (grado 1 o 2), intermediamente sensibles (grado 3 o 4) o resistentes al suero (grado 5 o 6). Se utilizó como control suero inactivado a 56°C.

5.9 Modelo de infección de ratón y curvas de sobrevivencia

Implementamos un modelo de ratón sano y otro diabético. El modelo diabético se realizó mediante la inoculación de la toxina β -pancreática, estreptozotocina (STZ). Se trabajaron grupos de 5 ratones de 4 semanas de edad los cuales previo a la inducción de diabetes se dejaron sin alimento una noche para medir los niveles de glucosa en ayunas. Se tomó una muestra de sangre de la cola del ratón, se colocaron de dos a tres gotas en el glucómetro OneTouch y se registraron las lecturas. Posteriormente, los ratones fueron pesados para calcular la dosis correspondiente de STZ de acuerdo a su peso. Se implementaron dos dosis de la toxina STZ administrada por vía intraperitoneal; la primera dosis fue de 75 mg/kg y la segunda dosis de 135 mg/kg la cual se administró posterior a tres días. Finalmente se registraron las lecturas de los niveles de glucosa a los 6 días de haber inoculado ambas dosis; se consideró una condición diabética a todos aquellos ratones con lecturas $>200 \text{ mg dl}^{-1}$ de glucosa en ayunas.

Para llevar a cabo las curvas de sobrevivencia se realizaron previamente las curvas de crecimiento de todas las cepas a probar en el modelo murino. Brevemente, a partir de un cultivo de 5 ml saturado se ajustó la DO ~ 1 y se inoculó 1 ml en un matraz con 30 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación. Se midió la DO a los 30 min, 1 h, 1h 30min, 2h y 3h. Para cada tiempo medido se tomó una fracción del cultivo para realizar diluciones seriadas y determinar el número de UFC para cada tiempo medido. Únicamente se plaquearon las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} las cuales se realizaron por triplicado.

Una vez determinado el tiempo que tarda cada cepa para llegar a fase logarítmica y el número de UFC aproximado se inocularon las cepas de *K. variicola* 8917, F2R9 y $\Delta\text{pKV8917}$ en grupos de 5 ratones de 6-7 semanas sanos y diabéticos. Los cultivos de células bacterianas en fase logarítmica temprana (DO 0.6) se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 5 min. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 1 ml de solución de PBS 1X. La solución que contenía PBS y células bacterianas se diluyeron y se inyectaron $100 \mu\text{l}$ que contenían 1×10^8 a 8×10^8 por vía intraperitoneal en ratones sanos y diabéticos. Los animales se controlaron dos veces al día durante 10 días después de la inoculación y se sacrificaron después de los 10 días. Únicamente la transconjugante F2R9_TC14 se inoculó como se

describió anteriormente en ratones sanos. Todos los estudios en animales fueron aprobados por el Comité de Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública

6. Secuenciación del genoma completo de *Klebsiella variicola* 8917

Las secuencias completas del cromosoma y el plásmido de *K. variicola* 8917 se determinaron mediante secuenciación por dos plataformas MinION e Illumina. Para la secuenciación por Illumina MiSeq, se extrajo el DNA genómico a partir de 5 ml de cultivo utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN Inc., Alemania). Para la secuenciación por MinION, se extrajo el DNA genómico a partir de un cultivo de 50 ml utilizando el kit de extracción de DNA de sangre y células (QIAGEN Inc., Alemania). Las concentraciones de DNA se midieron utilizando el Qubit dsDNA HS (Fisher Scientific Inc.) en un fluorómetro Qubit 3.0 (Fisher Scientific Inc.). Se realizó un ensamble de *novo* con las lecturas cortas de Illumina y lecturas de MinION utilizando ensambladores Canu v2.0 y SPAdes v3.1.1. Cromosoma y plásmido fueron anotados en la plataforma PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline) del NCBI. La secuencia tipo (ST) de los genomas de *K. variicola* se determinó de acuerdo con la plataforma de tipificación de secuencias multilocus de *K. variicola* (<https://mlstkv.insp.mx>). La identificación de genes de virulencia y la familia de plásmido en base a su grupo de incompatibilidad (Inc) se determinó mediante las herramientas de búsqueda BLASTn y PlasmidFinder 2.1 que se encuentran en el Centro de Epidemiología Genómica respectivamente.

6.1 Análisis comparativo de genoma y plásmido

Las comparaciones de plásmidos y genomas con otras estructuras fueron generadas por BLAST Ring Image Generator v.0.95.22 usando 90 y 70% como los puntos de corte superior y mínimo, respectivamente. Realizamos una comparación del genoma entre tres genomas de *K. variicola*: 8917, TUM111415 (no. de acceso BIKO01000005.1) y KvL18 (no. de acceso PRJNA612181). La comparación de plásmidos se llevó a cabo alineando los plásmidos pKV8917, p15WZ-82_Vir (no. de acceso CP032356.1), pVir_030666 (no. de acceso CP027063.3) y pKSB1_10J sin nombre2 (no. de acceso CP024517.1). También se incluyeron los cromosomas de *Raoultella terrigena* cepa NCTC13098 (no. de acceso NZ_LR131271.1), *Pantoea coffeiphila* (no. de acceso NZ_PDET01000010.1) y *Kosakonia radicincitans* cepa DSM

16656 (no. de acceso CP018016.1). Las secuencias completas del cromosoma y plásmido de *K. variicola* 8917 se actualizaron en la base de datos GenBank bajos los siguientes números de accesos CP063403 y CP063404.

6.2 Identificación de mutaciones de la cápsula

Los tipos capsulares se determinaron a partir de la secuencia completa del genoma utilizando la base de datos de referencia primaria del locus K de *Klebsiella* en la plataforma de Kaptive v.0.5.1 (42). La secuencia de nucleótidos del operón de la cápsula de *K. variicola* 8917 se utilizó como consulta en BLASTn para buscar cepas con el mismo tipo de cápsula. En este análisis se incluyen las cepas de *K. pneumoniae* QMP (no. de acceso LT174583.1), *K. variicola* 13450 (no. de acceso CP026013.1) y la cepa de *E. coli* CSF3273 (no. de acceso CP026932.2) las cuales se identificaron como KL114. Cada secuencia de proteína en el CPS (que comprende GalF y Ugd) se usó para alinear con CLUSTALW para buscar mutaciones en los genes de biosíntesis de la cápsula del genoma de *K. variicola* 8917. Se construyó un árbol filogenético con la secuencia de aminoácidos concatenados del grupo de cápsulas utilizando el software MEGAX. Se utilizó Easyfig para comparar los genes de la cápsula.

6.3 Análisis estadístico

Para diferencias significativas, implementamos una prueba t de Student de dos lados no apareados y un análisis de varianza unidireccional. Para las curvas de supervivencia, se realizaron pruebas en U de Mann-Whitney de dos colas utilizando el software Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

6. Resultados

Características moleculares y genéticas del aislamiento clínico *Klebsiella variicola* 8917

El aislamiento clínico de *K. variicola* 8917 fue identificado previamente mediante la prueba de filamento y se observó un filamento viscoso de más de 5 cm de largo; por lo tanto, se consideró hipermucoviscoso.

Tabla 7. Factores de virulencia y resistencia a metales pesados predichos a partir de la secuencia del genoma de *K. variicola* 8917.

Característica	Gen	Producto	% de Identidad (aminoácidos)
Factores de virulencia	<i>rmpADC</i>	Regulador del fenotipo mucoide	-
	<i>rmpA2</i>	Regulador del fenotipo mucoide	-
	<i>Uge</i>	Uridin-difosfato galacturonato-4-epimerasa	99.1
	<i>urea</i>	Ureasa	100
	<i>wabG</i>	Ácido glucurónico-transferasa	99.4
	<i>iroN</i>	Sideróforo	64.9
	<i>iutA</i>	Receptor de sideróforo	72.9
	<i>kfuABC</i>	Sideróforo	>98.6
	<i>entB</i>	Enterobactina	99.6
	<i>mceG</i>	Sistema de secreción tipo I	53.1
	<i>mrkABCDFHIJ</i>	Fimbria tipo 3	>86.8
	Metales pesados	<i>terZABCDE</i>	Proteínas de resistencia a Telurio
<i>terW</i>		98.2	

Posteriormente, se determinó que el aislamiento contenía un plásmido de ~200-kb denominado pKV8917 mediante el método de lisis alcalina (**Figura 17**). No obstante, la secuencia del plásmido mostró un plásmido más grande de 343-kb que no portaba ningún gen conocido de resistencia a antibióticos, únicamente codificaba la resistencia al metal pesado telurio (**Tabla 7**).

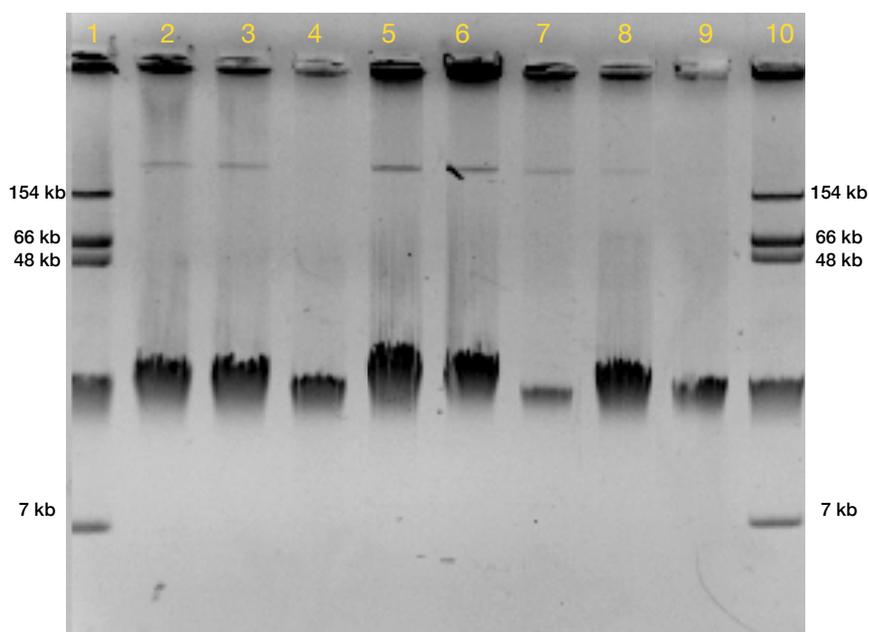


Figura 17. Perfil de plásmidos de: 2) y 3) *K. variicola* 8917, 4) Δ pKV8917, 5) *E. coli* J53-2_TC5, 6) *E. coli* J53-2_TC7, 7) F2R9_TC5, 8) F2R9_TC14 y 9) F2R9. Los carriles 1 y 10 corresponden a los marcadores de peso molecular obtenidos de la cepa *E. coli* NCTC 50192.

Los factores de virulencia se predijeron a partir de la secuencia del genoma por medio de BLASTp, el sistema de transporte de hierro Kfu (*kfuABC*), la enterobactina sideróforo (*entB*) y las fimbrias de tipo 3 (*mrkABCDFHIJ*) fueron encontrados en este genoma (**Tabla 7**). Esta cepa no codifica para colibactina, aerobactina o yersiniabactina. Sin embargo, encontramos un receptor que comparte 72% de identidad con el receptor *iutA* de la aerobactina (**Tabla 7**). Este tipo receptor con identidad del 70% se ha identificado ampliamente en genomas de *Klebsiella*, pero se requiere un análisis más detallado de las implicaciones de transportar receptores de sideróforos sobre la virulencia y patogénesis de la bacteria.

El plásmido pKV8917 confiere la hiper mucoviscosidad a *K. variicola* F2R9

Se obtuvieron transconjugantes a las 3 h y a las 24 h para *E. coli* J53-2^{RIFr} y a las 24 h para *K. variicola* F2R9^{NALr}. Se corroboró la adquisición del plásmido mediante la amplificación de los marcadores plasmídicos *terW*, *scrK* y *fruA* y la visualización de un plásmido de ~200-kb (**Figura 17**). Además, las transconjugantes fueron corroboradas mediante el perfil de bandas

amplificadas por ERIC-PCR y la secuencia concatenada de los genes *leuS*, *pgi* y *pyrG*, ambos análisis mostraron que las transconjugantes F2R9 provenían de la cepa parental *K. variicola* F2R9 (**Figura 18 y Figura 19A**). Asimismo, el perfil obtenido del ERIC-PCR de las transconjugantes J53-2_TC5 y J53-2_TC7 fue idéntico al de la cepa parental *E. coli* J53-2 (**Figura 19A**). La frecuencia de conjugación fue baja (10^{-8} UFC) en *K. variicola* F2R9^{NALr}; en contraste, cuando se usa la cepa *E. coli* J53-2^{RIFr}, la frecuencia de conjugación fue de 10^{-2} CFU (**Tabla 8**). Estos resultados mostraron que el plásmido pKV8917 es autotransmisible de manera más eficiente en *E. coli* J53-2^{RIFr} y en menor medida en *K. variicola* F2R9^{NALr}.

Tabla 8. Características de *K. variicola* 8917 y sus transconjugantes

Cepa donadora	Cepas receptoras	MS ^a	Tiempo de obtención de transconjugantes		Frecuencia de conjugación ^b	Marcadores plasmídicos		
			3 h	24 h		<i>scrK</i>	<i>fruA</i>	<i>terW</i>
<i>K. variicola</i> 8917	<i>K. variicola</i> F2R9 (NAL ^r /Tel ^s)	NAL +TEL	-	+	1.4×10^{-8} UFC	+	+	+
	<i>E. coli</i> J53-2 (Rif ^r /Tel ^s)	TEL+ RIF	+	+	6.9×10^{-2} UFC	+	+	+

NAL^r; resistente a Ácido Nalidíxico, Tel^s; sensible a Telurito, Rif^r; resistente a Rifampicina. ^aMS; medio de selección ya sea suplementado con Ácido Nalidíxico (NAL) y Telurito (TEL) o Rifampicina (RIF) y Telurito (TEL), ^bla frecuencia de conjugación fue determinada a las 24 h.

La estabilidad del plásmido se evaluó mediante pases sucesivos en medio LB sin telurito y de cada cultivo se tomó una parte para extracción de plásmidos y extracción de DNA total para llevar a cabo la amplificación de los marcadores de plasmídicos. El pKV8917 se mantuvo después de 10 pases consecutivos. Interesantemente, las transconjugantes F2R9_TC5 y F2R9_TC14 fueron positivas a la prueba de filamento; es decir, mostraron el fenotipo hmv.

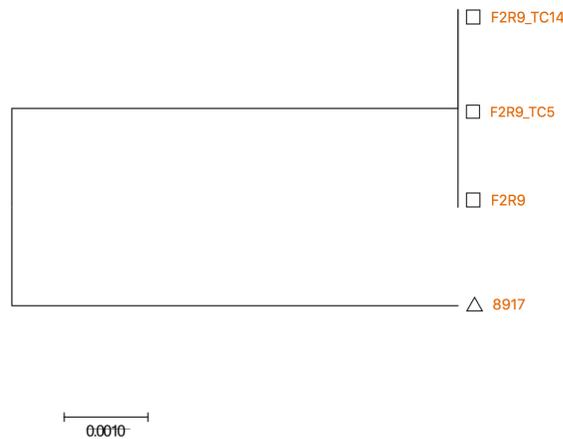


Figura 18. Árbol filogenético basado en la secuencia concatenada de genes *pgi*, *leuS* y *pyrG* de *K. variicola* 8917, *K. variicola* F2R9 y sus transconjugantes F2R9_TC5 y F2R9_TC14. La filogenia se generó con el método Neighbor Joining usando el software MEGAX.

Por el contrario, los transconjugantes J53-2_TC5 y J53_TC7 fueron negativos a la prueba de filamento (**Tabla 8**). Curiosamente, el filamento formado por las transconjugantes F2R9_TC5 y F2R9_TC14 no era del mismo tamaño que el mostrado por *K. variicola* 8917. Estos resultados muestran que el plásmido pKV8917 confiere la hmv a otras cepas de *K. variicola*, aunque a una baja frecuencia. Considerando la alta frecuencia de conjugación observada en *E. coli* J53-2, se ensayó un segundo experimento de conjugación usando a las cepas J53-2_TC7 y J53-2_TC5 como donadoras del pKV8917 con *K. variicola* F2R9^{NALr} como receptor; sin embargo, esta conjugación no tuvo éxito usando tanto medio líquido como sólido.

La eliminación del plásmido pKV8917 resulta en la pérdida de hipermucoviscosidad

La eliminación del plásmido pKV8917 se llevó a cabo mediante el uso del detergente químico SDS. Se observó crecimiento en las 6 concentraciones probadas; sin embargo, seleccionamos la concentración del 5% de SDS para analizarla posteriormente. Se evaluaron 1000 colonias de las cuales solo una colonia (cepa Δ pKV8917) se consideró libre del plásmido. Esto se corroboró por (i) la pérdida de resistencia a telurito, (ii) la ausencia de los genes plasmídicos *terW*, *scrK* y *fruA* (**Tabla 8**), y (iii) la ausencia del plásmido pKV8917 determinado por análisis de plásmidos (**Figuras 17 y 19B**).

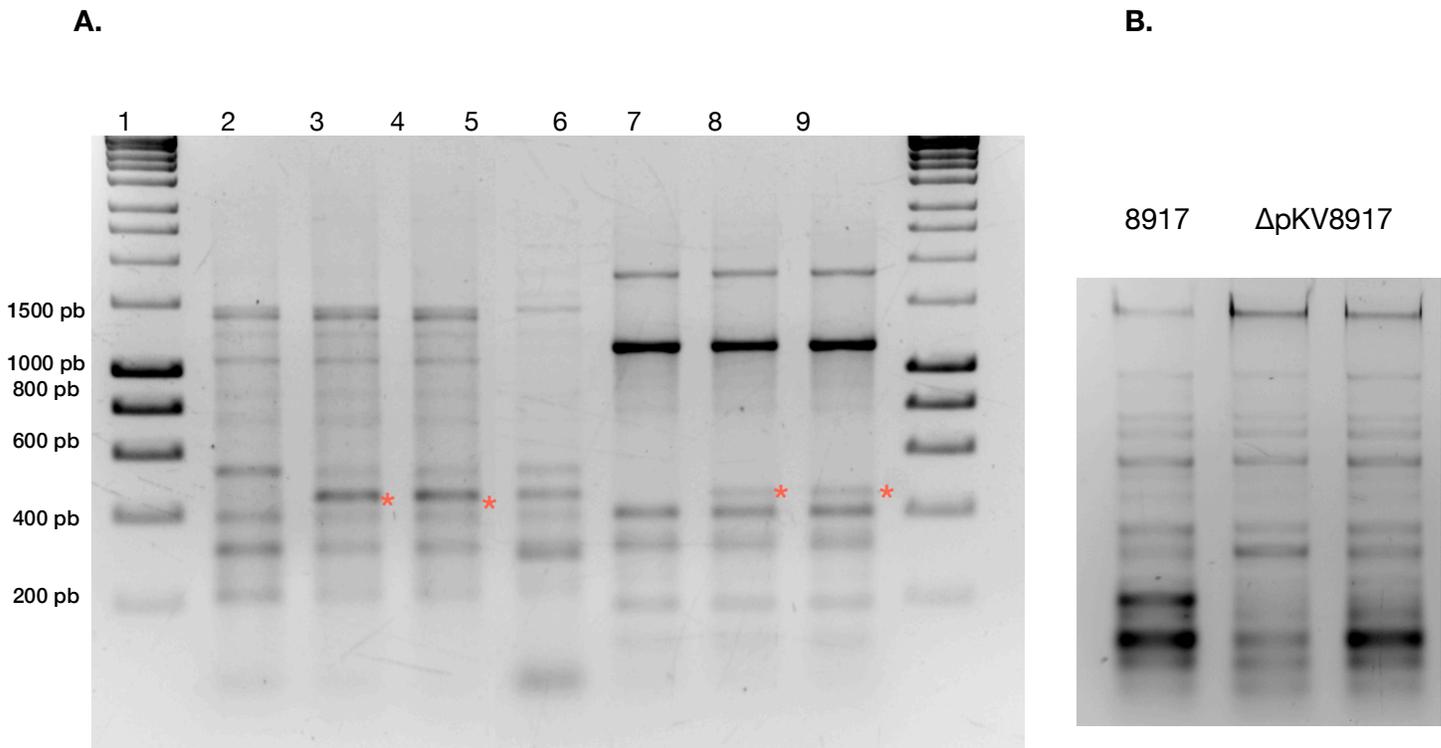


Figura 19. Patrón de bandas amplificadas mediante ERIC-PCR. **A.** Carriles 1 y 9) Marcador de peso molecular 1kb DNA plus. 2. *K. variicola* F2R9; 3. F2R9_TC5; 4. F2R9_TC14; 5. *K. variicola* 8917; 6. *E. coli* J-53-2; 7. J53-2_TC5; 8. J53-2_TC7. **B.** Patrón de bandas correspondiente a la cepa curada Δ pKV8917 en comparación con *K. variicola* 8917.

Interesantemente, al realizar la prueba de filamento en la cepa libre del plásmido se observó la incapacidad de la cepa Δ pKV8917 para formar el filamento viscoso, además el ensayo de mucoviscosidad reflejó una ligera reducción en la medición de DO (**Figura 20**). La pérdida de la hmv se observó con una frecuencia del 0.1% ya que solo una colonia de 1000 analizadas logro eliminar el plásmido. Este resultado confirma la relación que existe entre hmv y el plásmido pKV8917.

Klebsiella variicola 8917 es hipermucoviscosa y sedimenta a baja velocidad por centrifugación

El ensayo de mucoviscosidad o sedimentación se ha propuesto para medir el grado de hmv de una bacteria. El cultivo de la cepa de interés se somete a centrifugación a baja velocidad y la turbidez del sobrenadante se mide a una DO 600. Por lo general, las cepas hmv tienen poca sedimentación mostrando sobrenadantes turbios (Walker y Miller., 2020). A pesar de que *K. variicola* 8917 es hmv, al someterla a centrifugación a baja velocidad sedimenta bien (**Figura**

20). Esto resulta inusual ya que esta cepa no se comporta como otras cepas hmv/hv descritas en la literatura. Al comparar las cepas curadas (Δ pKV8917) y transconjugantes (F2R9_TC5 y F2R9_TC14) con sus respectivas cepas parentales, se observó una ligera diferencia (**Figura 20**). Con fines comparativos, se incluyó una cepa de KpnHV *rmpA*⁺/K2 (*K. pneumoniae* 10271) y, como se esperaba, no sedimentó bien, mostrando un sobrenadante turbio (DO600 0.6; **Figura 20**).

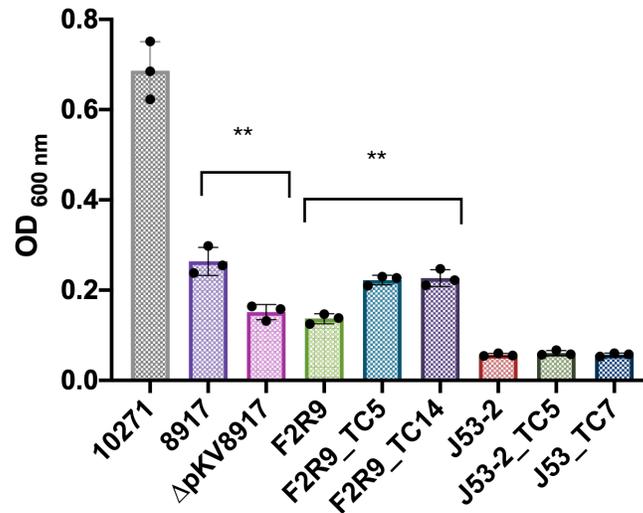


Figura 20. Nivel de sedimentación mostrada por *K. variicola* 8917 y sus transconjugantes. En este ensayo se incluyó la cepa hipervirulenta de *K. pneumoniae* 10271 como referencia la cual sabemos que tiene un bajo nivel de sedimentación.

La adquisición del plásmido pKV8917 aumenta la producción de la cápsula e impacta la fagocitosis por los macrófagos THP-1 pero no la resistencia al suero humano

El ácido glucurónico (GA) es un tipo de nucleótido de azúcar precursor del ácido urónico y un componente común de las cápsulas y los antígenos O (44). Se midió el GA para determinar la cantidad de CPS producida en las cepas parentales, curadas y transconjugantes. La **Figura 21A** indica que *K. variicola* 8917 produjo 63.2 μ g de GA μ g / 10^9 UFC, mientras que Δ pKV8917 mostró una reducción significativa en la producción de GA de más del 50% ($P < 0.001$); sin embargo, la eliminación del plásmido no abolió completamente la cápsula. El crecimiento en

agar MacConkey indicó que las cepas Δ pKV8917 y 8917 mantuvieron el fenotipo de colonia mucoide típicamente asociado con la presencia de una cápsula.

La fagocitosis es un proceso crucial para eliminar patógenos en las primeras etapas de la infección; sin embargo, muchas bacterias han desarrollado estrategias para evitar la fagocitosis y se han vuelto "resistentes" a la acción de los neutrófilos y macrófagos, que son componentes principales de la respuesta inmune innata (118). Las cápsulas son, con mucho, el principal factor de virulencia que protege a las bacterias contra la respuesta inmune del huésped al inhibir la fagocitosis y la lisis por el complemento y los péptidos antimicrobianos (9).

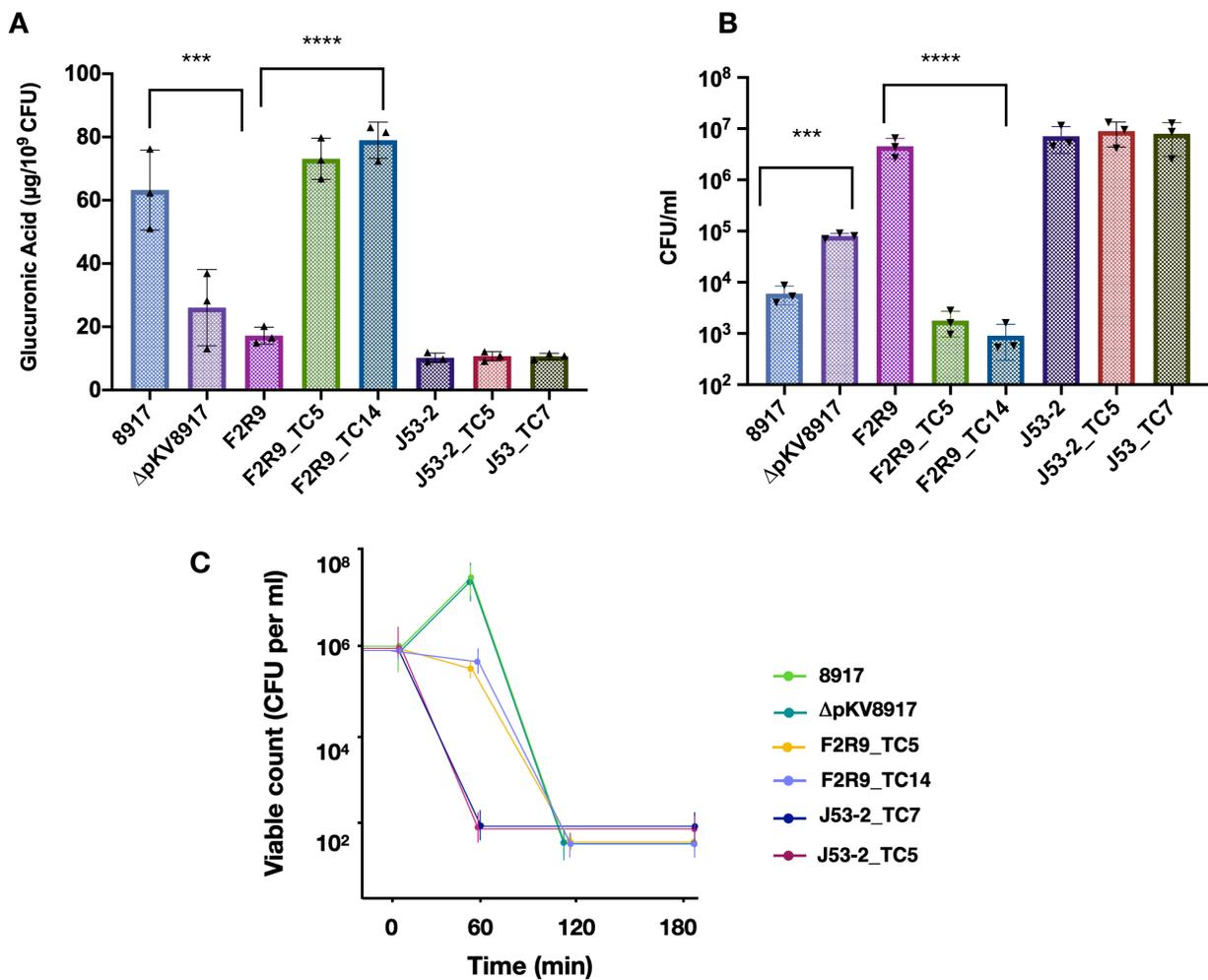


Figura 21. A. Cuantificación del ácido glucurónico, **B.** ensayo de resistencia a la fagocitosis y **C.** resistencia a suero humano

En este estudio, comparamos el nivel de fagocitosis en las cepas parental, curadas y transconjugantes. Nuestros resultados mostraron que *K. variicola* 8917 está siendo menos fagocitado por los macrófagos THP-1 que la cepa curada Δ pKV8917 ($P < 0.001$; **Figura 21B**). Además, los transconjugantes F2R9_TC5 y F2R9_TC14 también fueron menos fagocitados por macrófagos en comparación con la cepa parental F2R9 ($P < 0.0001$; **Figura 21B**). Estos datos se correlacionan con los cambios provocados por la pérdida o adquisición de pKV8917 sobre la producción de CPS. Este efecto no se observó en la cepa de *E. coli* J53-2 o sus transconjugantes porque a pesar de contener el plásmido pKV8917, estas cepas no mostraban la hmv (**Figura 21A**). El ensayo de resistencia a suero mostró grado 2 (sensible) para *K. variicola* F2R9, F2R9_TC5 F2R9_TC14, *E. coli* J53-2, J53-2_TC5 y J53-2_TC7 y grado 3 (intermediamente sensible) para *K. variicola* 8917 y *K. variicola* Δ pKV8917 (**Figura 21C**) de acuerdo a la clasificación de Podschun et al., (117).

La pérdida o adquisición del plásmido pKV8917 genera diferencias en la virulencia

El nivel de virulencia se evaluó en ratones sanos y diabéticos en un modelo de sepsis inducida. Para trabajar el modelo diabético se administraron dos dosis de STZ con 72 h de diferencia una de la otra. En la **Figura 22** se muestra una gráfica representativa que muestra la población de ratones antes de y después del tratamiento con STZ, en la mayoría de los casos se logra un 80-90% de ratones diabetizados. Al final de este protocolo se formaron grupos de 5 ratones diabéticos para ser inoculados con las diferentes cepas de este estudio.

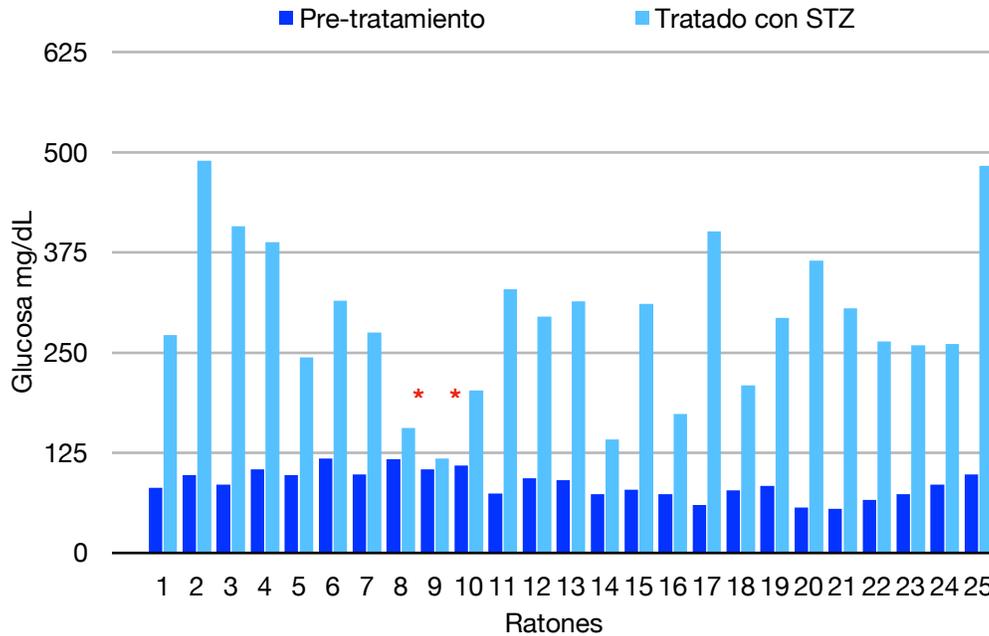


Figura 22. Gráfica representativa de los niveles de glucosa antes y después de la segunda dosis de la toxina β -pancreática STZ. En esta gráfica se representan 25 ratones tratados con STZ, los símbolos en asterisco representan ratones que a pesar de las dosis administradas no se logró inducir Diabetes. Los niveles de glucosa se determinaron en ayunas.

Los resultados de las curvas de sobrevivencia implementando ratones sanos mostraron que la tasa de mortalidad de *K. variicola* 8917 a 6×10^8 UFC fue del 100% a las 72 h; este efecto no se observó para la cepa $\Delta pKV8917$ a la misma dosis inoculada.

Por otro lado, los ratones infectados con 4×10^8 UFC de las cepas *K. variicola* 8917 y $\Delta pKV8917$, se observaron tasas de sobrevivencia del 40 y 80%, respectivamente (**Figura 23B**). Es claro que la virulencia de la cepa $\Delta pKV8917$ disminuye, aunque la tasa de mortalidad fue del 40% con la dosis más alta inoculada. Dosis más bajas de la cepa $\Delta pKV8917$ no dieron como resultado la mortalidad; además, la inoculación de *K. variicola* F2R9, que se usó como una cepa no hmv, no resultó en mortalidad, incluso a dosis altas.

Lo más importante es que los ratones que fueron infectados con 6×10^8 UFC de la transconjugante F2R9_TC14 mostraron una mortalidad del 40% a las 96 h (**Figura 23A**); sin embargo, se observó una mortalidad del 0% con una dosis más baja (4×10^8 UFC; **Figura 23B**). Por tanto, el nivel de virulencia de los transconjugantes F2R9_TC14 fue superior al de F2R9.

La diabetes se considera un factor de riesgo para las infecciones causadas por *K. pneumoniae*, especialmente por las cepas hipervirulentas (110;119); sin embargo, no se ha evaluado el factor de riesgo de las cepas con fenotipo hmv. Utilizando un modelo de ratón diabético, evaluamos si esta condición podría afectar la tasa de supervivencia cuando los ratones son desafiados con una cepa hmv en comparación con una cepa no hmv.

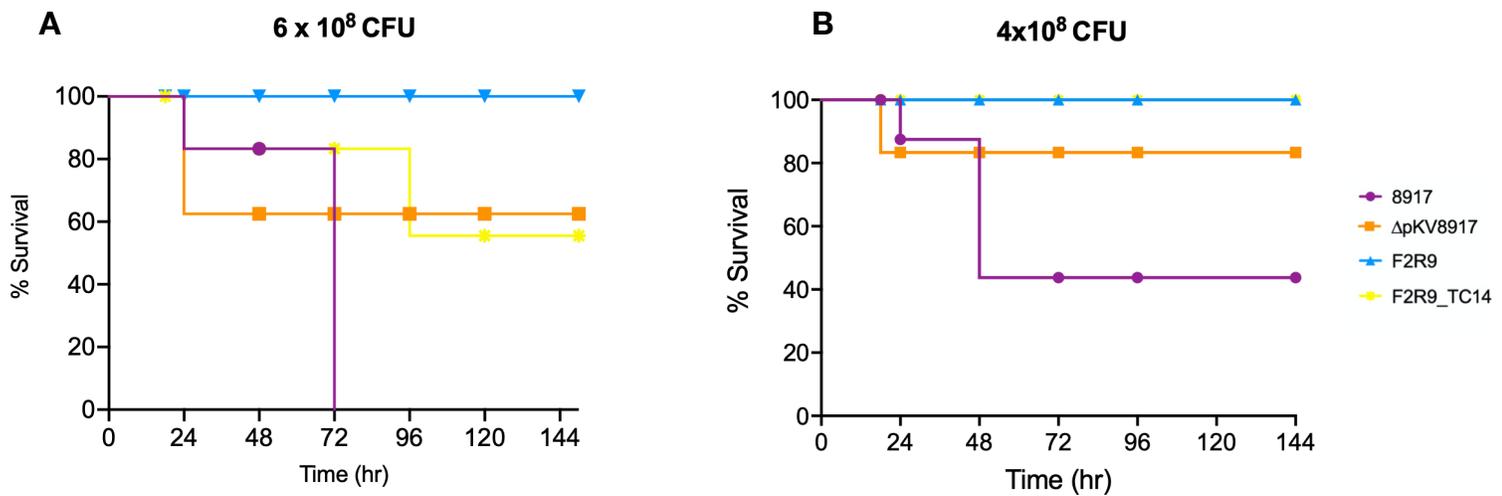


Figura 23. Curvas de supervivencia en ratones sanos inoculados con las cepas *K. variicola* 8917, Δ pKV8917, F2R9 y F2R9_TC14 a dos concentraciones bacterianas.

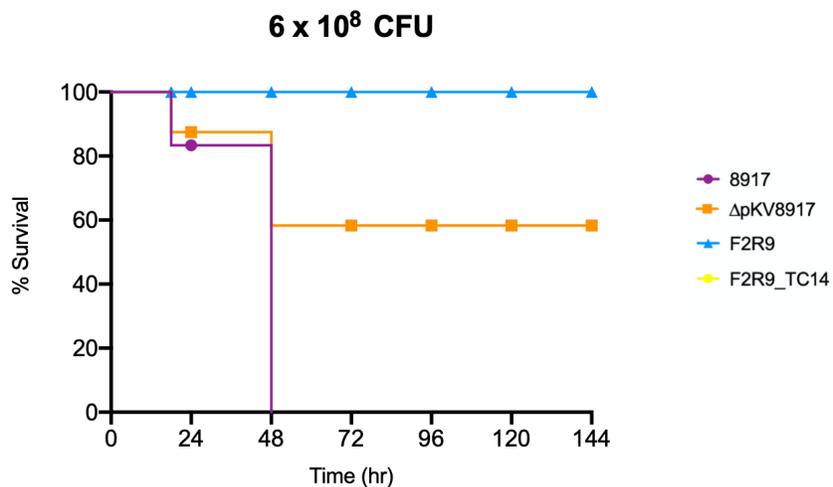


Figura 24. Curva de supervivencia de ratones hiperglicémicos inoculados con las cepas *K. variicola* 8917, F2R9, Δ pKV8917 y F2R9_TC14.

Los ratones diabéticos inoculados con 6×10^8 UFC de la cepa *K. variicola* 8917 mostraron una mortalidad del 100% a las 48 h en contraste con los ratones sanos (72 h; **Figura 24**). No se observó mortalidad con las cepas Δ pKV8917 y *K. variicola* F2R9 en ratones diabéticos a la misma dosis bacteriana inoculada (**Figuras 23A, B**).

pKV8917 tiene una estructura única con grupo de incompatibilidad IncFIB

En la **Figura 25** se muestra la estructura del plásmido pKV8917 (343-kb). La secuencia completa del plásmido pKV8917 se comparó con la de los plásmidos p15WZ-82_Vir (282,290-bp) (69), pVIR_030666 (235,448-bp) (94), y el plásmido sin nombre (212,079-bp) recuperado de la cepa KSB1_10J de *K.pneumoniae* productora de CTX-M-15 (120). El plásmido pKV8917 mostró un 99% de identidad y 49% de cobertura con el plásmido de virulencia p15WZ-82_Vir y el plásmido pKSB1_10J sin nombre, ambos auto-transmisibles (**Figura 25**). Las regiones compartidas entre estos plásmidos codificaban genes responsables del mantenimiento y movilización del plásmido entre ellos la maquinaria de conjugación (*tra*), genes de mantenimiento de plásmidos (*parAB/sopAB*), sistema de toxina-antitoxina (TA) de tipo I (*hokB*), sistema de reparación de ADN de error (*umuCD*), el cluster de genes de resistencia al telurio (*ter*), proteína nucleoide similar a histona (H-NS) y varias proteínas hipotéticas (**Figura 25**). Otra característica común entre estos plásmidos fue el grupo de incompatibilidad IncFIB; sin embargo, el pVir_030666 contenía una familia de replicones adicional, el IncHI1B (94).

Observamos una región que no se alineaba con plásmidos bacterianos, pero si identificamos regiones alineadas con cromosomas bacterianos. El análisis de la región única del plásmido pKV8917 mostró regiones alineadas con los cromosomas de *Pantoea coffeiphila* y *Raoultella terrigena* NCTC13098 (**Figura 25**).

Dentro de esta región identificamos un grupo de genes encargados de la biosíntesis de celulosa (*bcs*), un sistema de fosfotransferasa dependiente de fructosa (*fru*) (PTS) y dos genes que codifican un PTS dependiente de sacarosa (*scr*). El cluster *bcs* fue encontrado en *R. terrigena* NCTC13098 y en cinco genomas de *K. variicola* (VRCO0297, VRCO0299, VRCO0486,

VRCO0296 y VRCO0300 del BioProject PRJEB18814). El sistema fru-PTS tuvo una alta identidad con un PTS de *P. coffeiphila*. Los genes que codifican el fru-PTS y el cluster de celulosa estaban flanqueados por dos secuencias de inserción (IS6), lo que sugiere su movilización e integración en el plásmido pKV8917 (**Figura 25**).

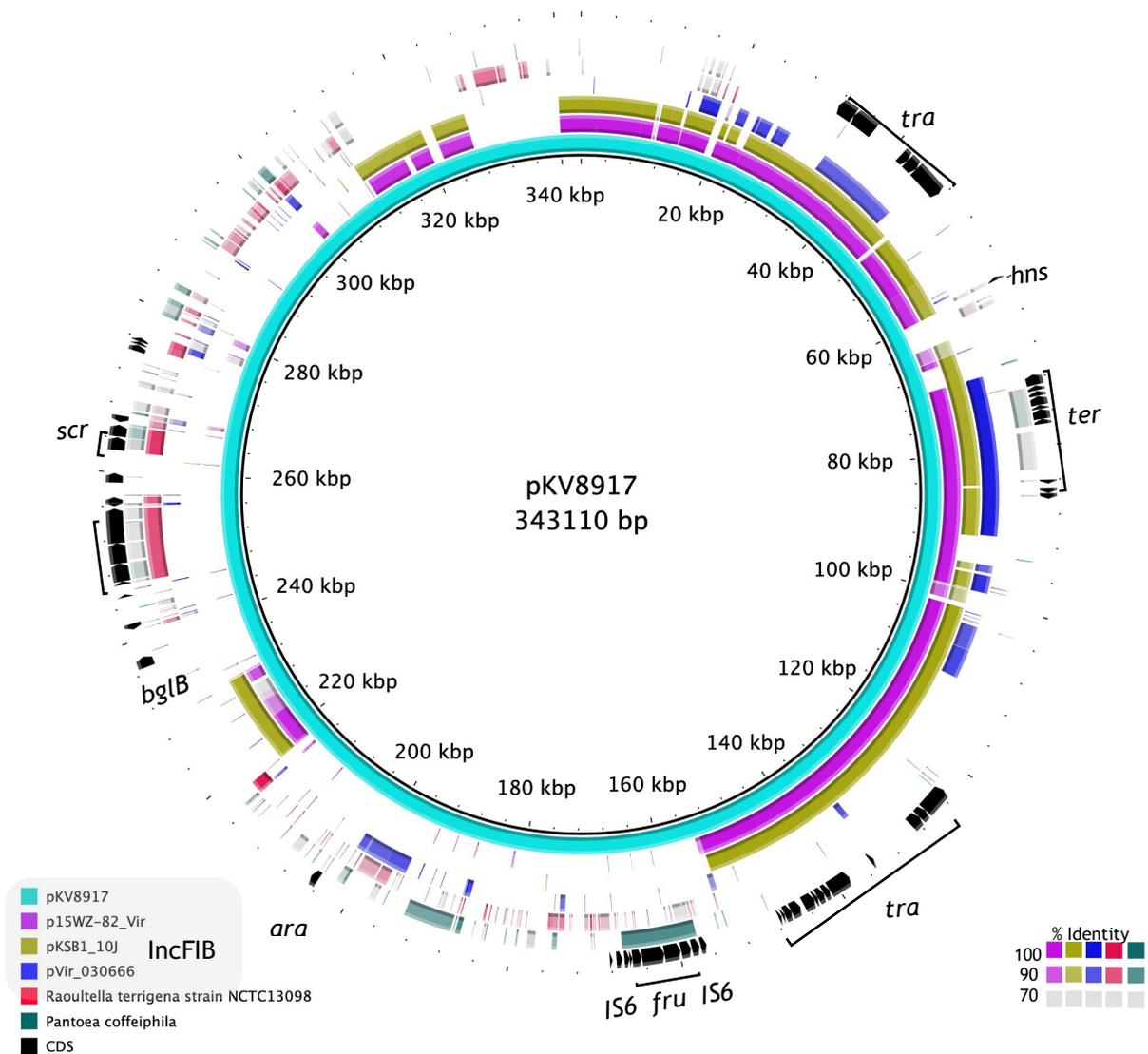


Figura 25. Alineamiento del plásmido pKV8917 con los plásmidos de virulencia pVir_030666, p15WZ-82_Vir, pKSB1_10J. En este análisis también se incluyen los cromosomas de *Raoultella terrigena* NCTC13098 y *Pantoea coffeiphila*.

Los dos genes que codifican un PTS de sacarosa (*scr*) presentaron una identidad significativa con este sistema encontrado en *R. terrigena* NCTC13098. También identificamos la presencia de reguladores transcripcionales como *araC*, *iclR*, *hha* y *hns*; *araC* e *iclR* exhibieron una alta similitud y cobertura con los reguladores *araC* e *iclR* que se encuentran en *Kosakonia* sp. Aunque el plásmido pKV8917 comparte regiones con plásmidos conocidos, su estructura genética es única. Por otro lado, identificamos dos aislamientos clínicos Kv18L y TUM14115 con el fenotipo hmv, obtenidos de infección endodóntica y bacteriemia, respectivamente (121;122). Una búsqueda mediante BLASTp de las proteínas RmpADC y RmpA2 contra estos dos genomas confirmó su ausencia. El alineamiento de los genomas 8917, Kv18L y TUM14115 mostró una identidad de nucleótidos de ~ 95% (**Figura 26**). El análisis por BLASTn reveló que TUM111415 carecía de un replicón plasmídico porque todos los “contigs” del ensamble correspondían a aciertos cromosómicos, mientras que para Kv18L se identificaron varios “contigs” asociados a plásmido. Debido a que el aislamiento clínico TUM111415 aparentemente carece de plásmido y Kv18L no cuenta con plásmidos secuenciados completamente, no realizamos una comparación de plásmidos entre pKV8917 y otros plásmidos de cepas de *K. variicola* con el fenotipo hmv.

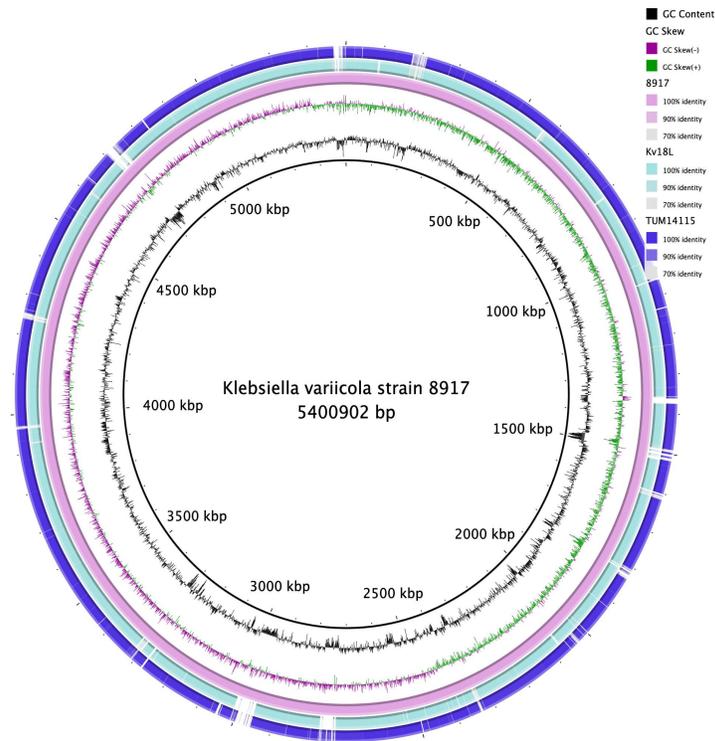


Figura 26. Alineamiento de los cromosomas de genomas de *K. variicola* hmv 8917, Kv18L y TUM11415. El anillo interno corresponde a *K. variicola* 8917.

Análisis de la cápsula de *Klebsiella variicola*

El análisis de mutaciones en los genes que codifican a las proteínas de la cápsula mostró que, aunque todo el K-Locus se conserva entre las cepas con el tipo capsular KL114, hay varias sustituciones de aminoácidos en las proteínas CPS (**Figura 27**). La glicosiltransferasa (GT_KL114) fue el gen más diverso con 16 sustituciones. Además, observamos que los loci de la cápsula de las cepas de *K. variicola* están más estrechamente relacionados en comparación con *K. pneumoniae* (**Figura 27**).

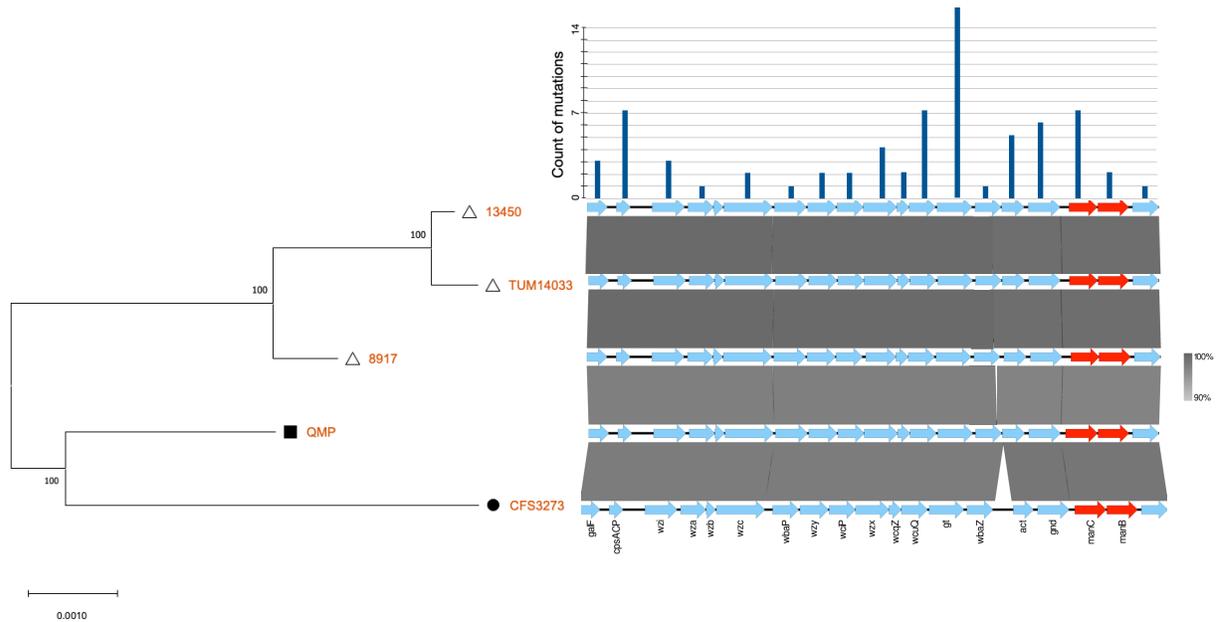


Figura 27. Filogenia realizada con la secuencia de aminoácidos concatenada de las proteínas 19 proteínas que conforman el tipo capsular KL114. El triángulo representa las cepas *K. variicola* 13450, TUM14033 y 8917, el cuadrado representa la cepa *K. pneumoniae* QMP y con un círculo se muestra la cepa de *E. coli* CFS3273. Además, la comparación del locus completo de la cápsula KL114 se muestra con flechas los cuales corresponden a los CDS. Las barras grises indican regiones de similitud y las regiones más oscuras indican un mayor grado de similitud. Las flechas rojas corresponden a la síntesis y procesamiento de proteínas de manosa (ManC y ManB). El número de mutaciones encontradas en los *cps* se representa con barras azules tomando como referencia el *cps* de *K. pneumoniae* QMP.

Debido a que no conocemos los rasgos fenotípicos de las cepas incluidas en este análisis, no podemos asociar las mutaciones en los genes de biosíntesis de la cápsula de *K. variicola* 8917 con el fenotipo hmv, por lo que esto debe investigarse más a fondo.

Por otro lado, se identificaron otros tipos de cápsulas en aislamientos hmv de *K. variicola*, Kv18L y TUM14115, KL34 y KL125. Además, los genes *manCB*, que son responsables de la síntesis de GDP-D-manosa, un componente común de las cápsulas, se identificaron en los loci de cápsulas de los genomas de *K. variicola* F2R9 y 8917. Por otro lado, los aislamientos hipervirulentos de *K. variicola* utilizados para la comparación de plásmidos (15WZ-82 y WCHKP030666) poseían el tipo de capsular KL16.

7. Discusión

El aislamiento de *Klebsiella variicola* 8917 mostró un fenotipo hipermucoviscoso definido por la prueba de filamento. Al realizarse la prueba de centrifugación a baja velocidad parece comportarse como una bacteria con fenotipo no hmv cuando se compara con *K. pneumoniae* 10271, la cual es una cepa hv-hmv debido a la presencia de los genes *rmpADC*. Nosotros proponemos que la propiedad de sedimentación observada en *K. variicola* 8917 podría depender de los polisacáridos que conforman la cápsula e incluso de la composición de la mucoviscosidad *per se*; la cual podría variar entre cepas hmv y conducir a una pobre sedimentación típicamente asociada con *K. pneumoniae* hv-hmv. Walker et al., (2020) propusieron una serie de ensayos para evaluar la producción de la cápsula y los fenotipos de virulencia asociados a esta estructura (43). Tomando como precedente los ensayos sugeridos se evaluó la producción de la cápsula a través de la cuantificación del ácido glucurónico y el ensayo de mucoviscosidad. Cuando el plásmido pKV8917 fue adquirido por la cepa *K. variicola* F2R9, notamos que las transconjugantes (F2R9_TC5 / TC14) producían más cápsula que las cepas *K. variicola* 8917 y F2R9 (**Figura 21A**). En particular, los transconjugantes J53-2_TC7 y J53-2_TC5 mantuvieron el mismo nivel de GA, de acuerdo con los resultados del ensayo de mucoviscosidad y la cuantificación de ácido glucurónico (**Figuras 20 y 21A**). Las transconjugantes F2R9_TC5 y F2R9_TC14 también fueron menos fagocitadas por macrófagos en comparación con su cepa parental F2R9 ($P < 0.0001$). Sin embargo, el ensayo de resistencia a suero humano mostró sensibilidad a la lisis mediada por el complemento, por lo que al parecer la hipermucoviscosidad es una característica ventajosa para evadir la fagocitosis, pero no previene la acción bactericida del sistema del complemento (**Figura 21C**). La fagocitosis y la producción de CPS se correlacionan con los cambios provocados por la pérdida o adquisición del plásmido pKV8917, pero de manera inconsistente, la medición de la mucoviscosidad fue menor de lo esperado; aunque la prueba de filamento fue positiva, el filamento en las transconjugantes no tenía el mismo tamaño que el producido por la cepa *K. variicola* 8917. Un resultado similar se observó en el trabajo de Yang et al., (2019) (68), quienes transfirieron el plásmido de virulencia p15WZ-82_Vir (el cual codifica para varios factores de virulencia entre ellos los reguladores de fenotipo hmv *rmpADC*) a varias cepas de *Klebsiella*

con diferente STs y tipos capsulares, el resultado de la prueba de mucoviscosidad mostró que las transconjugantes no producían la misma turbidez que la cepa parental pero se observó una elevada producción de la cápsula. Se requiere de un análisis más detallado de los efectos de adquirir un plásmido que transfiere la hipermucoviscosidad a cepas con el mismo tipo de cápsula que la cepa donante, esto podría explicar por qué la hipermucoviscosidad no se exhibe al mismo nivel que la cepa que alberga el plásmido.

Por otro lado, la adquisición del plásmido pKV8917 por la cepa de *E. coli* J53-2 no resultó en cambios fenotípicos; sin embargo, la frecuencia de conjugación fue alta en la cepa de *E. coli* J53-2 pero no en la cepa *K. variicola* F2R9. Haudiquet et al., (2020) han comprobado que la tasa de conjugación disminuye en cepas con cápsula a diferencia de las que carecen de esta estructura (123). Además, se sabe que la cápsula oculta el LPS (124) que, junto con las porinas OmpA, se consideran sitios clave para la unión de los pili conjugativos durante las fases iniciales de la conjugación (125;126). Wyres et al., (2019) especulan que la sobreexpresión de la cápsula en clonas hipervirulentas e hipermucoviscosas puede resultar en una reducción de la captación de DNA y posiblemente a una menor tasa de conjugación (33). Dado que los tipos de cápsulas difieren sustancialmente en su grosor y composición de polisacáridos (127), también es probable que su influencia sobre la captación del DNA dependa del tipo capsular. Por ejemplo, la cápsula K2, que está asociada con cinco de los seis clones de *K. pneumoniae* hipervirulentos, y se considera entre los tipos de cápsulas más gruesas, por lo tanto, puede tener una menor captación de DNA (33).

Actualmente, los reportes de *K. variicola* hmv son limitados (**Tabla 9**); sin embargo, en ninguno de ellos se explora el mecanismo involucrado y particularmente en México, no hay reportes adicionales. La clasificación errónea de *K. variicola* como *K. pneumoniae* puede afectar la identificación de *K. variicola* con fenotipo hmv. Los estudios en los que se han identificado aislamientos de *K. variicola* hmv han tenido como objetivo el caracterizar aislamientos propiamente de *K. pneumoniae* o del complejo *K. pneumoniae*. La mayoría de los estudios que existen hasta el momento se han enfocado en caracterizar aislamientos KpnHV de origen comunitario; no obstante, Harada et al., (2019) llevaron a cabo un estudio epidemiológico para investigar la circulación de cepas de KpnHV asociadas a infecciones adquiridas en el hospital o en centros de salud en Japón (121). Para ello evaluaron las características clínicas y

moleculares de aislamientos de *K. pneumoniae* causantes de bacteriemias en varios hospitales. Analizaron 140 aislamientos previamente identificados como *K. pneumoniae* por algún método automatizado. Al realizar la secuenciación de los genomas se corroboró que 102 aislamientos correspondieron a *K. pneumoniae*, 24 aislamientos a *K. variicola* y 14 a *K. quasipneumoniae*. De los aislamientos incluidos en el estudio se buscaron cepas hipermucoviscosas por medio de la prueba de filamento y factores de virulencia propios de cepas de KpnHV como lo son *rmpA*, *rmpA2*, *iucABCD-iutA* e *iroBCDN*. Interesantemente, en este conjunto de aislamientos se identificaron tres aislamientos de *K. variicola* positivos a la prueba de filamento, de los cuales dos de ellos portaban *rmpA*, el cluster *iroBCDN* y el tipo capsular KL2. En el otro aislamiento con fenotipo hmv no se identificaron los genes *rmpA* o *rmpA2* por lo que se catalogó dentro de la categoría KvaHVMV. De manera similar, Imai et al., (2019) realizaron un estudio comparativo de las características clínicas de aislamientos de *K. pneumoniae*, *K. variicola* y *K. quasipneumoniae* causantes de bacteremias. En este estudio reportan 2/21 aislamientos de *K. variicola* con el fenotipo hmv sin los genes *rmpADC/rmpA2* asociados (128). Finalmente, un reporte reciente realizado por Nakamura-Silva et al., (2020) obtuvieron un aislamiento (Kv18L) de una infección localizada entre la dentina y la pulpa (122). Particularmente, se resalta que *K. variicola* 18L exhibía el fenotipo hmv denotado por la prueba de filamento y de igual manera que los aislamientos anteriores la ausencia de los genes responsables de la hmv en KpnHV no fueron encontrados en este aislamiento (**Tabla 9**).

Tabla 9. Características de los aislamientos de *K. variicola* hipermucoviscosa (KvaHVMV)

Cepa	Muestra	Origen	<i>rmpA/rmpA</i> ₂	ST	KL	Plásmidos (Inc)	Referencias
8917	Espuito	Hospitalario	-	2	114	IncFIB(K)	Garza-Ramos et al., (2015)
TUM14115	Bacteriemia	Hospitalario	-	256	125	-	Harada et al., (2019)
18L	Pulpa	Comunitario	-	169	34	IncFIB(K), IncFII(K), IncR y Col440I	Nakamura-Silva et al., (2020)
1_hmv_J	Bacteriemia	Hospitalario	-	ND	ND	ND	Imai et al., (2019)
2_hmv_J	Bacteriemia	Hospitalario	-	ND	ND	ND	Imai et al., (2019)

-; no se identificaron replicones correspondientes a plásmidos en la cepa TUM14115. ND; no determinado ya que estos aislamientos no cuentan con datos de secuenciación

Se han descrito otras especies además de *K. variicola* y *K. pneumoniae* que exhiben el fenotipo hmv, estas son: *K. quasipneumoniae* subs. *similipneumoniae* y *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (56;57). Además, en nuestra colección de cepas bacterianas, identificamos un aislamiento de *E. coli*, *K. oxytoca* y numerosos aislamientos de *K. pneumoniae* con el fenotipo hmv pero sin los genes *rmpADC* y *rmpA2* (datos no publicados). Este fenómeno sugiere la existencia de mecanismos alternativos para expresar hipermucoviscosidad. El fenotipo hmv en *K. pneumoniae* hv se considera un rasgo de virulencia (58;59); sin embargo, en un contexto genético no asociado a hipervirulencia, su implicación ha sido pobremente caracterizado.

En conjunto, los experimentos de conjugación y el curado del plásmido sugieren la presencia de un mecanismo novedoso involucrado tanto en la hmv como en la hiperproducción de la cápsula. Además, evaluamos el nivel de virulencia y fagocitosis de las cepas que adquirieron el plásmido pKV8917; tanto en una cepa no hmv y su eliminación en la cepa parental *K. variicola* 8917. Las cepas F2R9_TC14 y F2R9_TC5 que adquirieron el plásmido fueron menos fagocitadas que la cepa F2R9 parental. Es probable que este efecto esté asociado con la presencia de la hipermucoviscosidad e hiperproducción de la cápsula, estas características se han relacionado con una alta resistencia a la captación fagocítica por parte de los macrófagos (9). Aunque *K. variicola* F2R9 posee un comportamiento "avirulento", la transconjugante F2R9_TC14 tuvo una mortalidad del 40%; por tanto, la adquisición de pKV8917 condujo a un aumento de la virulencia. En contraste, la cepa Δ pKV8917 fue fagocitada en mayor número que la cepa *K. variicola* 8917, lo que es consistente con una reducción en la producción de la cápsula, el fenotipo hmv y su virulencia.

Otros determinantes de virulencia codificados por plásmidos también podrían contribuir a la virulencia; por ejemplo, el operón de resistencia al telurio (*terZABCDE* y *terW*), el cual está altamente distribuido en cepas de KpnHV y otras especies del complejo *K. pneumoniae* con fenotipo hmv (56;110;129). Los genes *ter* son parte de un sistema de respuesta a estrés y no solamente confieren la resistencia al metal pesado. El operón *ter* se ha considerado como un factor de virulencia involucrado en la patogénesis de algunas bacterias como *Bacillus anthracis*

(56;130). Del mismo modo, nuestros datos mostraron que los ratones diabéticos desafiados con la cepa de *K. variicola* 8917 con fenotipo hmv tienen peor desenlace, con una muerte rápida de la población total de ratones que ocurre en menos tiempo y son más propensos a la infección que los ratones infectados con una cepa no hmv (*K. variicola* F2R9).

Así mismo, *K. variicola* ocupa diversos nichos ambientales (4); sin embargo, se ha propuesto que *K. variicola* puede transmitirse a los humanos por medio de fitonosis; es decir, adquisición de bacterias provenientes de plantas hacia los humanos (4; 88). No obstante, *K. variicola* comparte algunos nichos ambientales con bacterias ambientales, y por ende pudo haber ocurrido intercambio de material genético con algunas de estas especies bacterianas; por lo que proponemos que el plásmido pKV8917 pudo haberse originado a partir de fragmentos de DNA provenientes de cepas ambientales incorporados en un plásmido conjugativo de *K. pneumoniae* dando como resultado un plásmido quimérico (**Figura 28**). Este escenario es plausible tomando en cuenta que el grupo de incompatibilidad IncFIB identificado en pKV8917 está altamente diseminado entre plásmidos de cepas clínicas y comunitarias de *K. pneumoniae* (3).

La vía RmpADC es una cascada regulatoria compleja que desencadena la hmv en *K. pneumoniae* hipervirulenta. Sospechamos que los genes asociados a la hmv en *K. variicola* 8917 pueden provenir de cepas ambientales y estar relacionados con genes involucrados en el estatus metabólico, particularmente aquellos involucrados en el transporte de azúcares como los PTS dependientes de fructosa y sacarosa. El costo metabólico para ensamblar la cápsula y producir la hmv podría ser alto y requiere más precursores para completar ambos procesos; esto puede explicar el papel de los PTS en ambos procesos.

No se ha descrito la biosíntesis de celulosa en especies del género *Klebsiella*. Sin embargo, esta característica se mantiene en todo el reino vegetal y algunas especies bacterianas, como *Rhizobium* sp. y *Acetobacter* sp. (131). Curiosamente, identificamos otros aislamientos de *K. variicola* que albergan los genes de biosíntesis de celulosa. La celulosa es un polisacárido complejo extracelular; sin embargo, no sabemos si los loci de celulosa en *K. variicola* 8917 podrían sumar al fenotipo hipermucoviscoso. Finalmente, la participación de los genes reguladores transcripcionales *araC* e *iclR* en la regulación de vastos procesos como el metabolismo del carbono, la virulencia y el bypass de glioxilato es intrigante porque pueden

estar participando indirectamente en el circuito regulador del fenotipo hipermucoviscoso. Se requieren experimentos adicionales para evaluar el papel de estos genes sobre el fenotipo hipermucoviscoso en *K. variicola* 8917.

El número creciente de aislamientos de *K. pneumoniae* que presentan el fenotipo hipermucoviscoso sin un genotipo de hipervirulencia asociado es intrigante y sugiere que otros mecanismos moleculares están implicados. Recientemente, Ernst et al., (2020) reportaron nuevos fenotipos asociados a la cápsula mediados por deleciones o mutaciones cromosómicas únicas en genes de biosíntesis de la cápsula entre *K. pneumoniae* ST258 (47). Encontraron mutantes hipercapsuladas debido a una mutación sin sentido en el gen *wzc* (G565S). Esta sustitución se buscó en el aislado de *K. variicola* 8917; sin embargo, no se encontró ninguna mutación en el gen *wzc* en esa posición, y no detectamos mutaciones en los genes *rcaAB* o *lon*. Al comparar el tipo de cápsula KL114 de tres cepas diferentes de *K. variicola*, identificamos que algunos genes de la cápsula son muy variables como lo es la glicosiltransferasa. Es de destacar que los *cps* de las tres cepas de *K. variicola* eran más similares que el KL114 de *K. pneumoniae* (**Figura 27**). El KL114 es un tipo de cápsula poco común entre *K. pneumoniae*; es posible que no se haya abordado la presencia de subtipos dentro de KL114 debido a datos de secuencia limitados. No obstante, la composición y diversidad de los loci de las cápsulas de *K. variicola* merecen un estudio en detalle.

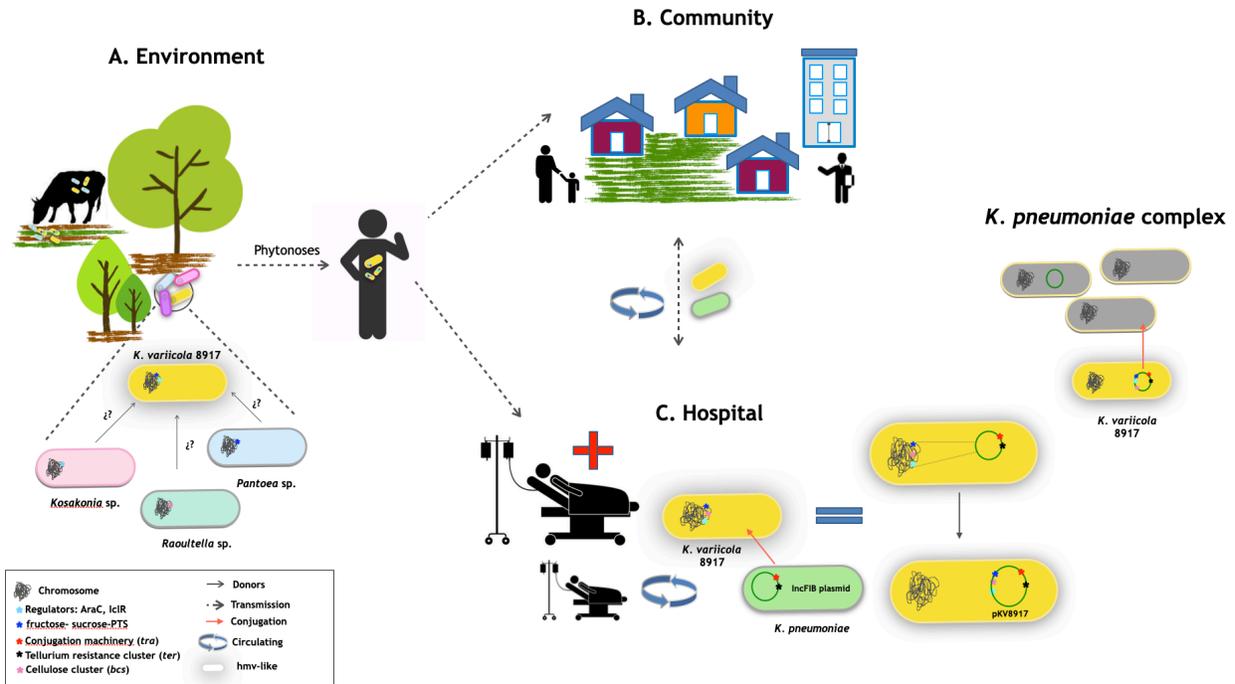


Figura 28. Modelo propuesto para explicar el surgimiento del plásmido pKV8917. (A) *K. variicola* es ubicua en el suelo, las plantas, los animales y el agua. Estos nichos naturales poseen una población bacteriana diversa y permiten que *K. variicola* coexista con otras bacterias endófitas y bacterias colonizantes del intestino de de animales. Se propone que *Pantoea* sp. *Kosakonia* sp. y *Raoultella* sp. fueron donantes de regiones genéticas a *K. variicola* 8917 posiblemente por transferencia horizontal. *Raoultella* sp. se aísla con mayor frecuencia del intestino de los animales y las aguas residuales, por lo que *K. variicola* 8917 podría haber adquirido el grupo de biosíntesis de celulosa (*bcs*) en este lugar. Nuestra hipótesis es que la hiper mucoviscosidad fue adquirida por especies bacterianas del medio ambiente. Por fitonosis, los humanos se infectan por *K. variicola* 8917 que podría ser transportado a la comunidad (B) o al hospital (C) en este escenario, *K. variicola* coexiste con *K. pneumoniae*. Los plásmidos IncFIB (IncFIBp) generalmente se asocian con cepas virulentas y resistentes a múltiples fármacos; IncFIBp lleva el módulo de transferencia (*tra*) y el operón de resistencia al telurio (*ter*), IncFIBp se transfirió mediante conjugación a *K. variicola* 8917 hmv. IncFIBp sirve como columna vertebral para la incorporación de los elementos genéticos adquiridos a partir de cepas ambientales que dan como resultado la estructura pKV9817. pKV8917 podría transferir el tipo hmv a especies del *K. pneumoniae* complejo (D) pero también adquiere virulencia y genes de resistencia a múltiples fármacos.

8. Conclusión

K. variicola 8917 contiene el plásmido pKV8917 con la capacidad de transferir la hipermucoviscosidad a otra cepa de *K. variicola*. La adquisición del plásmido pKV8917 desencadena un aumento en la producción de la cápsula con un efecto en virulencia, especialmente con riesgo en poblaciones diabéticas. Este es el primer estudio que explora otro mecanismo involucrado en la hipermucoviscosidad en una especie distinta de *K. pneumoniae*. Además, propone un nuevo mecanismo transmitido por plásmidos que podría diseminarse entre el complejo *K. pneumoniae*. Los genes candidatos involucrados en la hipermucoviscosidad pudieran ser aquellos que participan en el metabolismo y transporte de azúcares, los cuales pudieran estar compensado el costo energético para ensamblar la cápsula y producir la hipermucoviscosidad. La hipermucoviscosidad se ha detectado con mayor frecuencia y al parecer múltiples vías pueden desencadenarla. Las implicaciones de este fenotipo cuando no existe un fondo hipervirulento merecen un análisis más detallado ya que este fenotipo puede desempeñar un papel como factor de virulencia.

9. Referencias

- (1) Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. The genus *Klebsiella*. 2006.
- (2) Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998 Oct;11(4):589-603.
- (3) Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol 2020 Jun;18(6):344-59.
- (4) Rodriguez-Medina N, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. Emerg Microbes Infect 2019;8(1):973-88.
- (5) Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, Martinez-Romero E, Tinoco P, Pina-Gonzales M, Barrios H, et al. Development of a multiplex-PCR probe system for the proper identification of *Klebsiella variicola*. BMC Microbiol 2015 Mar 13;15:64.
- (6) van BA, Welker M, Pincus D, Charrier JP, Girard V. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues? Ann Lab Med 2017 Nov;37(6):475-83.
- (7) Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin Infect Dis 2013 Aug;57(4):564-72.
- (8) Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Front Microbiol 2018;9:3000.
- (9) Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev 2016 Sep;80(3):629-61.
- (10) Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther 2013 Mar;11(3):297-308.
- (11) Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. Clin Infect Dis 2017 Jul 15;65(2):208-15.
- (12) Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. mSphere 2016 Sep;1(5).
- (13) Shimasaki T, Seekatz A, Bassis C, Rhee Y, Yelin RD, Fogg L, et al. Increased Relative Abundance of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* Within the Gut Microbiota Is Associated With Risk of Bloodstream Infection in Long-term Acute Care Hospital Patients. Clin Infect Dis 2019 May 30;68(12):2053-9.
- (14) Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. Trends Microbiol 2016 Dec;24(12):944-56.
- (15) Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 2017 May 1;41(3):252-75.
- (16) Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother 2009 Aug;53(8):3365-70.
- (17) Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007 Jul;20(3):440-58, table.
- (18) Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. Front Microbiol 2016;7:895.
- (19) Nordstrom K. Plasmid R1--replication and its control. Plasmid 2006 Jan;55(1):1-26.
- (20) Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods 2005 Dec;63(3):219-28.
- (21) Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2010 Dec;65(12):2518-29.
- (22) Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, Pickup RW, Saunders JR. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. Microbiology (Reading) 2000 Sep;146 (Pt 9):2267-75.

- (23) Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. Arch Intern Med 1991 Aug;151(8):1557-9.
- (24) Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. Clin Infect Dis 2014 Jan;58(2):225-32.
- (25) Wang JH, Liu YC, Lee SS, Yen MY, Chen YS, Wang JH, et al. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clin Infect Dis 1998 Jun;26(6):1434-8.
- (26) Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol 2018;8:4.
- (27) Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, et al. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical K. pneumoniae. J Clin Microbiol 2018 Sep;56(9).
- (28) Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, Tsai SF, Wang JT. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. J Bacteriol 2008 Jan;190(2):515-26.
- (29) Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. Emerg Infect Dis 2014 Nov;20(11):1812-20.
- (30) Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci U S A 2015 Jul 7;112(27):E3574-E3581.
- (31) Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. Lancet Infect Dis 2018 Jan;18(1):37-46.
- (32) Lam MMC, Wyres KL, Duchene S, Wick RR, Judd LM, Gan YH, et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. Nat Commun 2018 Jul 13;9(1):2703.
- (33) Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. PLoS Genet 2019 Apr;15(4):e1008114.
- (34) Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallares R, Dominguez MA, Linares J, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). Clin Microbiol Infect 2016 Feb;22(2):154-60.
- (35) Benham A, Davis J, Puzio C, Blakey G, Slobodov G. Renal abscess yields elusive hypermucoviscous phenotype of, uropathogenic *Escherichia coli*: a case report. J Okla State Med Assoc 2013 Nov;106(11):435-8.
- (36) Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog 2015 Feb;11(2):e1004691.
- (37) Walker KA, Miner TA, Palacios M, Trzilova D, Frederick DR, Broberg CA, et al. A *Klebsiella pneumoniae* Regulatory Mutant Has Reduced Capsule Expression but Retains Hypermucoviscosity. mBio 2019 Mar 26;10(2).
- (38) Smith KD. Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated *iroA* gene cluster. Int J Biochem Cell Biol 2007;39(10):1776-80.
- (39) Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. Infect Immun 2015 Aug;83(8):3325-33.
- (40) Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. Microb Genom 2016 Aug;2(8):e000073.
- (41) Orskov I, Orskov F. 4 serotyping of *Klebsiella*. Methods Microbiol 1984;14:143-64.
- (42) Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. Microb Genom 2016 Dec;2(12):e000102.
- (43) Walker KA, Miller VL. The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. Curr Opin Microbiol 2020 Feb 12;54:95-102.

- (44) Shu HY, Fung CP, Liu YM, Wu KM, Chen YT, Li LH, et al. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology (Reading)* 2009 Dec;155(Pt 12):4170-83.
- (45) Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 2006;75:39-68.
- (46) Rendueles O. Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. *Mol Microbiol* 2020 May;113(5):883-8.
- (47) Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Osorio CA, Zagieboylo AP, Li L, Pironti A, et al. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Med* 2020 May;26(5):705-11.
- (48) Tan YH, Chen Y, Chu WHW, Sham LT, Gan YH. Cell envelope defects of different capsule-null mutants in K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* can affect bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* 2020 May;113(5):889-905.
- (49) Phanphak S, Georgiades P, Li R, King J, Roberts IS, Waigh TA. Super-Resolution Fluorescence Microscopy Study of the Production of K1 Capsules by *Escherichia coli*: Evidence for the Differential Distribution of the Capsule at the Poles and the Equator of the Cell. *Langmuir* 2019 Apr 23;35(16):5635-46.
- (50) Rendueles O, Garcia-Garcera M, Neron B, Touchon M, Rocha EPC. Abundance and co-occurrence of extracellular capsules increase environmental breadth: Implications for the emergence of pathogens. *PLoS Pathog* 2017 Jul;13(7):e1006525.
- (51) Rendueles O, de Sousa JAM, Bernheim A, Touchon M, Rocha EPC. Genetic exchanges are more frequent in bacteria encoding capsules. *PLoS Genet* 2018 Dec;14(12):e1007862.
- (52) Dorman MJ, Feltwell T, Goulding DA, Parkhill J, Short FL. The Capsule Regulatory Network of *Klebsiella pneumoniae* Defined by density-TraDISort. *mBio* 2018 Nov 20;9(6).
- (53) Palacios M, Miner TA, Frederick DR, Sepulveda VE, Quinn JD, Walker KA, et al. Identification of Two Regulators of Virulence That Are Conserved in *Klebsiella pneumoniae* Classical and Hypervirulent Strains. *mBio* 2018 Aug 7;9(4).
- (54) Ares MA, Fernandez-Vazquez JL, Rosales-Reyes R, Jarillo-Quijada MD, von BK, Torres J, et al. H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of *Klebsiella pneumoniae* by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:13.
- (55) Majdalani N, Gottesman S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* 2005;59:379-405.
- (56) Arena F, Henrici De AL, Pieralli F, Di P, V, Giani T, Torricelli F, et al. Draft Genome Sequence of the First Hypermucoviscous *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* Isolate from a Bloodstream Infection. *Genome Announc* 2015 Sep 17;3(5).
- (57) Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, Catalan-Najera J, Barrios H, Rodriguez-Medina N, Garza-Gonzalez E, et al. Draft Genome Sequence of a Hypermucoviscous Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Clinical Isolate. *Genome Announc* 2016 Jul 7;4(4).
- (58) Nassif X, Fournier JM, Arondel J, Sansonetti PJ. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun* 1989 Feb;57(2):546-52.
- (59) Walker KA, Treat LP, Miller VL. The small protein RmpD drives hypermucoviscosity in *Klebsiella pneumoniae*. *Preprint* 20 A.D. Jan 9.
- (60) Nassif X, Honore N, Vasselon T, Cole ST, Sansonetti PJ. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1989 Oct;3(10):1349-59.
- (61) Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology (Reading)* 2011 Dec;157(Pt 12):3446-57.
- (62) Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene* 2004 Aug 4;337:189-98.
- (63) Lai YC, Peng HL, Chang HY. RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *J Bacteriol* 2003 Feb;185(3):788-800.
- (64) Cheng HY, Chen YS, Wu CY, Chang HY, Lai YC, Peng HL. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Bacteriol* 2010 Jun;192(12):3144-58.

- (65) Mike LA, Stark AJ, Forsyth VS, Vornhagen J, Smith SN, Bachman MA, et al. A systematic analysis of hypermucoviscosity and capsule reveals distinct and overlapping genes that impact *Klebsiella pneumoniae* fitness. PLoS Pathog 2021 Mar;17(3):e1009376.
- (66) Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. mBio 2015 Jul 21;6(4):e00630.
- (67) Pilla G, Tang CM. Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. Nat Rev Microbiol 2018 Aug;16(8):484-95.
- (68) Yang X, Dong N, Chan EW, Zhang R, Chen S. Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. Trends Microbiol 2021 Jan;29(1):65-83.
- (69) Yang X, Wai-Chi CE, Zhang R, Chen S. A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*. Nat Microbiol 2019 Dec;4(12):2039-43.
- (70) Dong N, Lin D, Zhang R, Chan EW, Chen S. Carriage of blaKPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2018 Dec 1;73(12):3317-21.
- (71) Shen D, Ma G, Li C, Jia X, Qin C, Yang T, et al. Emergence of a Multidrug-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 23 Strain with a Rare bla CTX-M-24-Harboring Virulence Plasmid. Antimicrob Agents Chemother 2019 Mar;63(3).
- (72) Breurec S, Melot B, Hoen B, Passet V, Schepers K, Bastian S, et al. Liver Abscess Caused by Infection with Community-Acquired *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*. Emerg Infect Dis 2016 Mar;22(3):529-31.
- (73) Blin C, Passet V, Touchon M, Rocha EPC, Brisse S. Metabolic diversity of the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. Environ Microbiol 2017 May;19(5):1881-98.
- (74) Rosenblueth M, Martinez L, Silva J, Martinez-Romero E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. Syst Appl Microbiol 2004 Feb;27(1):27-35.
- (75) Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhruf A, Kalin M, Naucier P, et al. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. PLoS One 2014;9(11):e113539.
- (76) Barrios-Camacho H, Aguilar-Vera A, Beltran-Rojel M, Aguilar-Vera E, Duran-Bedolla J, Rodriguez-Medina N, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella variicola* obtained from different sources. Sci Rep 2019 Jul 23;9(1):10610.
- (77) Long SW, Linson SE, Ojeda SM, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al. Whole-Genome Sequencing of a Human Clinical Isolate of the Novel Species *Klebsiella quasivariicola* sp. nov. Genome Announc 2017 Oct 19;5(42).
- (78) Potter RF, Lainhart W, Twentyman J, Wallace MA, Wang B, Burnham CA, et al. Population Structure, Antibiotic Resistance, and Uropathogenicity of *Klebsiella variicola*. mBio 2018 Dec 18;9(6).
- (79) Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. Crit Care Med 2001 Jul;29(7 Suppl):S109-S116.
- (80) Farzana R, Jones LS, Rahman MA, Andrey D, Sands K, Portal E, et al. Outbreak of Hypervirulent Multi-Drug Resistant *Klebsiella variicola* causing high mortality in neonates in Bangladesh. Clin.Infect.Dis. 2018.
- (81) Garza-Ramos U, Martinez-Romero E, Silva-Sanchez J. SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico. Salud Publica Mex 2007 Nov;49(6):415-21.
- (82) Berry GJ, Loeffelholz MJ, Williams-Bouyer N. An Investigation into Laboratory Misidentification of a Bloodstream *Klebsiella variicola* Infection. J Clin Microbiol 2015 Aug;53(8):2793-4.
- (83) Garza-Ramos U, Moreno-Dominguez S, Hernandez-Castro R, Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, et al. Identification and Characterization of Imipenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Susceptible *Klebsiella variicola* Isolates Obtained from the Same Patient. Microb Drug Resist 2016 Apr;22(3):179-84.
- (84) Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. J Chemother 2017 Dec;29(sup1):2-9.
- (85) Long SW, Linson SE, Ojeda SM, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, et al. Whole-Genome Sequencing of Human Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates Reveals Misidentification and Misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. mSphere 2017 Jul;2(4).
- (86) Seki M, Gotoh K, Nakamura S, Akeda Y, Yoshii T, Miyaguchi S, et al. Fatal sepsis caused by an unusual *Klebsiella* species that was misidentified by an automated identification system. J Med Microbiol 2013 May;62(Pt 5):801-3.

- (87) Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, et al. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet* 2008 Jul 25;4(7):e1000141.
- (88) Andrade BG, de Veiga RN, Marin MF, Fonseca EL, Vicente AC. The genome of a clinical *Klebsiella variicola* strain reveals virulence-associated traits and a p19-like plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 2014 Nov;360(1):13-6.
- (89) Martinez-Romero E, Rodriguez-Medina N, Beltrán-Rojel M, Silva-Sanchez J, Barrios-Camacho H, Perez-Rueda E, et al. Genome misclassification of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* isolated from plants, animals and humans. *Salud Publica Mex* 2018;60(1):29-40.
- (90) Di DY, Jang J, Unno T, Hur HG. Emergence of *Klebsiella variicola* positive for NDM-9, a variant of New Delhi metallo-beta-lactamase, in an urban river in South Korea. *J Antimicrob Chemother* 2017 Apr 1;72(4):1063-7.
- (91) Zurfluh K, Nuesch-Inderbinen MT, Poirel L, Nordmann P, Hachler H, Stephan R. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48 beta-lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob Resist Infect Control* 2015;4:9.
- (92) Hopkins KL, Findlay J, Doumith M, Mather B, Meunier D, D'Arcy S, et al. IMI-2 carbapenemase in a clinical *Klebsiella variicola* isolated in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2017 Apr 3.
- (93) Joo EJ, Kim SJ, Baek M, Choi Y, Seo J, Yeom JS, et al. Fecal Carriage of Antimicrobial-Resistant *Enterobacteriaceae* in Healthy Korean Adults. *J Microbiol Biotechnol* 2018 Jul 28;28(7):1178-84.
- (94) Lu Y, Feng Y, McNally A, Zong Z. Occurrence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella variicola*. *J Antimicrob Chemother* 2018 Nov 1;73(11):3001-4.
- (95) Gomi R, Matsuda T, Yamamoto M, Chou PH, Tanaka M, Ichiyama S, et al. Characteristics of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Wastewater Revealed by Genomic Analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2018 May;62(5).
- (96) Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiol Spectr* 2014 Oct;2(5).
- (97) Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015 Jul 7;112(27):E3574-E3581.
- (98) Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo TA, Criscuolo A, Brisse S. Description of *Klebsiella africana* sp. nov., *Klebsiella variicola* subsp. *tropica* subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov. *Res Microbiol* 2019 Feb 25.
- (99) Pinto-Tomas AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FS, Cleland WW, et al. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science* 2009 Nov 20;326(5956):1120-3.
- (100) Medrano EG, Forray MM, Bell AA. Complete Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from a Known Cotton Insect Boll Vector. *Genome Announc* 2014 Aug 21;2(4).
- (101) Fontana L, Bonura E, Lyski Z, Messer W. The Brief Case: *Klebsiella variicola*-Identifying the Misidentified. *J Clin Microbiol* 2019 Jan;57(1).
- (102) Hathaway JJ, Sinsabaugh RL, Dapkevicius ML, Northup DE. Diversity of Ammonia Oxidation (*amoA*) and Nitrogen Fixation (*nifH*) Genes in Lava Caves of Terceira, Azores, Portugal. *Geomicrobiol J* 2014;31(3):221-35.
- (103) Podder MP, Rogers L, Daley PK, Keefe GP, Whitney HG, Tahlan K. *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. *PLoS One* 2014;9(9):e106518.
- (104) Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U, Rodriguez-Medina N, Barrios-Camacho H. Exploring the environmental traits and applications of *Klebsiella variicola*. *Brazilian Journal of Microbiology* (under review) 2021.
- (105) Reyna-Flores F, Barrios-Camacho H, Dantan-Gonzalez E, Ramirez-Trujillo JA, Lozano Aguirre Beltran LF, Rodriguez-Medina N, et al. Draft Genome Sequences of Endophytic Isolates of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella pneumoniae* Obtained from the Same Sugarcane Plant. *Genome Announc* 2018 Mar 22;6(12).
- (106) Guo Y, Zhai Y, Zhang Z, Li D, Wang Z, Li J, et al. Complete Genomic Analysis of a Kingdom-Crossing *Klebsiella variicola* Isolate. *Front Microbiol* 2018;9:2428.
- (107) Dong N, Lin D, Zhang R, Chan EW, Chen S. Carriage of blaKPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2018 Dec 1;73(12):3317-21.

- (108) Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genom* 2018 Sep;4(9).
- (109) Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene* 2004 Aug 4;337:189-98.
- (110) Passet V, Brisse S. Association of tellurite resistance with hypervirulent clonal groups of *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2015 Apr;53(4):1380-2.
- (111) Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984 Jul;12(1):19-36.
- (112) El-Mansi M, Anderson KJ, Inche CA, Knowles LK, Platt DJ. Isolation and curing of the *Klebsiella pneumoniae* large indigenous plasmid using sodium dodecyl sulphate. *Res Microbiol* 2000 Apr;151(3):201-8.
- (113) Bachman MA, Breen P, Deornellas V, Mu Q, Zhao L, Wu W, et al. Genome-Wide Identification of *Klebsiella pneumoniae* Fitness Genes during Lung Infection. *mBio* 2015 Jun 9;6(3):e00775.
- (114) Catalan-Najera JC, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Sagal-Prado A, Hernandez-Castro R, Garcia-Mendez J, et al. Molecular characterization and pathogenicity determination of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates serotype K2 in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019 Jul;94(3):316-9.
- (115) Lin MH, Hsu TL, Lin SY, Pan YJ, Jan JT, Wang JT, et al. Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol Cell Proteomics* 2009 Dec;8(12):2613-23.
- (116) Hughes C, Phillips R, Roberts AP. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect Immun* 1982 Jan;35(1):270-5.
- (117) Podschun R, Teske E, Ullmann U. Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1991 Nov;192(3):279-85.
- (118) Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007 Oct 18;449(7164):819-26.
- (119) Catalan-Najera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence* 2017 Apr 12;1-13.
- (120) Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Judd LM, Wyres KL, Thomson NR, et al. Antimicrobial-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carriage and Infection in Specialized Geriatric Care Wards Linked to Acquisition in the Referring Hospital. *Clin Infect Dis* 2018 Jul 2;67(2):161-70.
- (121) Harada S, Aoki K, Yamamoto S, Ishii Y, Sekiya N, Kurai H, et al. Clinical and Molecular Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Bloodstream Infections in Japan: Occurrence of Hypervirulent Infections in Health Care. *J Clin Microbiol* 2019 Nov;57(11).
- (122) Nakamura-Silva R, Macedo LMD, Cerdeira L, Oliveira-Silva M, Silva-Sousa YTC, Pitondo-Silva A. First report of hypermucoviscous *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* causing primary endodontic infection. *Clin Microbiol Infect* 2020 Aug 6.
- (123) Haudiquet M, Buffet A, Rendueles O, Rocha EPC. The interplay between the bacterial capsule and mobile genetic elements determines direction and intensity of gene flux in *Klebsiella pneumoniae*. *bioRxiv* doi:<https://doi.org/10.1101/2020.12.09.417816> 2020.
- (124) Clements A, Gaboriaud F, Duval JF, Farn JL, Jenney AW, Lithgow T, et al. The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. *PLoS One* 2008;3(11):e3817.
- (125) Anthony KG, Sherburne C, Sherburne R, Frost LS. The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol Microbiol* 1994 Sep;13(6):939-53.
- (126) Perez-Mendoza D, de la Cruz F. *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: are there any? *BMC Genomics* 2009 Feb 9;10:71.
- (127) Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep* 2015 Oct 23;5:15573.
- (128) Imai K, Ishibashi N, Kodana M, Tarumoto N, Sakai J, Kawamura T, et al. Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. *BMC Infect Dis* 2019 Nov 8;19(1):946.

- (129) Harada S, Aoki K, Ishii Y, Ohno Y, Nakamura A, Komatsu M, et al. Emergence of IMP-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* carrying a pLVPK-like virulence plasmid. *Int J Antimicrob Agents* 2019 Jun;53(6):873-5.
- (130) Franks SE, Ebrahimi C, Hollands A, Okumura CY, Aroian RV, Nizet V, et al. Novel role for the *yceGH* tellurite resistance genes in the pathogenesis of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 2014 Mar;82(3):1132-40.
- (131) Saxena IM, Kudlicka K, Okuda K, Brown RM, Jr. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol* 1994 Sep;176(18):5735-52.