



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos
y carbapenémicos en *Klebsiella pneumoniae*

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Alan Cano Kobayashi



DIRECTOR DE TESINA:
Dr. Eric Monroy Pérez

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA, UNAM, PAPIIT IN225020.

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 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.

INDICE

Resumen.....	3
Objetivo	4
Introducción	5
Características de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
Patogenicidad y virulencia.....	7
Adhesinas.....	7
Sistemas de adquisición de hierro, sideróforos.....	9
Protectinas	10
Toxinas.....	11
Descripción del genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
Actividad antimicrobiana.....	18
Resistencia antimicrobiana.....	19
Mecanismos de resistencia	20
Degradación enzimática	20
Mecanismo de las β -lactamasas.	23
β -lactamasas de <i>K. pneumoniae</i>	26
Carbapenémicos	28
Carbapenemasas	28
Mecanismo de las carbapenemasas.....	28
Mecanismo de hidrólisis por la clase A de β -lactamasas	28
Mecanismo de hidrólisis por la clase B de β -lactamasas	30
Mecanismo de hidrólisis por la clase C de β -lactamasas.....	31
Mecanismo de hidrólisis por la clase D de β -lactamasas.....	32
Conclusiones	34
Bibliografía	35

Resumen

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gramnegativa, aerobia, y anaerobia facultativa, pertenece a la familia Enterobacteriaceae, habita el suelo, agua, plantas, es miembro de la microbiota del tracto gastrointestinal y de la nasofaringe de mamíferos, y es considerada como uno de los patógenos oportunistas más frecuentes en el humano, ocasionando infecciones hospitalarias, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (trasplantes de órganos, enfermedades crónicas del hígado, diálisis, quimioterapia, diabetes), además de neumonía, bacteremia, meningitis, abscesos en hígado, e infecciones de heridas quirúrgicas y también infecciones crónicas de las vías urinarias adquiridas en la comunidad. La patogenicidad de *K. pneumoniae* se debe a los diferentes genes de virulencia que posee, que incluyen adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, protectinas o invasinas y toxinas. El tratamiento de las infecciones por *Klebsiella pneumoniae* se ha complicado en los últimos años, debido al surgimiento de cepas multi-drogo resistentes (MDR). Las cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes acarrean genes de resistencia a los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim, quinolonas, cloranfenicol, así como a los betalactámicos por la expresión de betalactamasas de espectro extendido (ESBLs) [*blaTEM* (contracción de Temoneira), *blaSHV* (sulfhídrido variable), *blaCTX-M* (cefotaxima) y *blaOXA* (oxacilina)]. El tratamiento de elección de las infecciones causadas por cepas de *K. pneumoniae* productoras de ESBLs han sido los carbapenémicos, sin embargo, recientemente se han identificado cepas portadoras de diferentes genes de resistencia a estos agentes. Debido a lo anterior el propósito de este trabajo fue realizar una revisión sobre los principales factores de virulencia de *K. pneumoniae*, así como también describir los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos betalactámicos y carbapenémicos en *Klebsiella pneumoniae*.

Objetivo

General:

- Describir los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos betalactámicos y carbapenémicos en *Klebsiella pneumoniae*.

Particulares:

- Determinar los factores de virulencia más frecuentes durante la infección por *K. pneumoniae*.
- Analizar los mecanismos de acción y de resistencia bacteriana a los antibióticos.

Introducción

Características de *Klebsiella pneumoniae*

El género *Klebsiella* habita el agua y suelo, es considerado parte de la microbiota normal de la nariz, boca, intestinos de humanos y animales. Todas las especies son Gramnegativas, móviles e inmóviles. Los miembros de este grupo son más cortos y gruesos que otros en la familia Enterobacteriaceae, generalmente miden de 0.3 a 1.5 μm de ancho por 0.5 a 5.0 μm de largo y se presentan en forma de varillas rectas (Ristuccia & Cunha 1984). La mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* producen gas como resultado de la fermentación de carbohidratos (Brooks *et al.*, 2017).

La membrana citoplasmática cumple la función de barrera osmótica bajo el modelo de bicapa fosfolipídica. Es un centro de actividad metabólica debido a la cantidad de proteínas que presenta.

El peptidoglicano es un heteropolímero de aminoazúcares (N-acetil-glucosamina y N-acetil-murámico), y aminoácidos (D-glutámico, meso-diaminopimédico, L- y D-alanina). Las cadenas peptídicas se unen entre sí mediante la D-alanina de una cadena y el ácido meso-diaminopimédico de otra cadena; a través de la L-alanina se unen al N-acetil-murámico, ambas uniones utilizan un enlace amida. El peptidoglicano está involucrado en el mantenimiento de la forma y la ósmosis celular.

El periplasma queda circunscrito entre la membrana celular y la membrana externa. Está formado por una matriz polipeptídica y polisacárida. Su función está centrada en la captación de solutos, la transformación de ciertos compuestos, como los antibióticos, y el control de la presión osmótica (Chaves, 2001). La estructura de la membrana celular se representa en la figura 1.

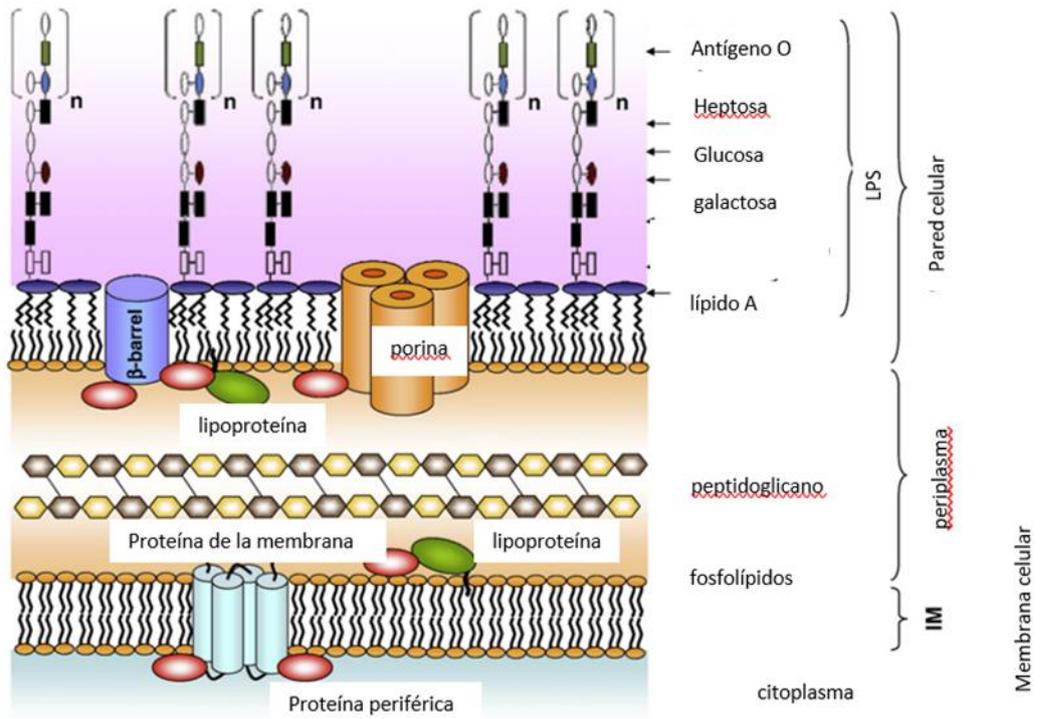


Figura 1. Estructura de la membrana y pared celular de las bacterias Gram negativas (Tomado de Sperandeo *et al.*, 2009).

Patogenicidad y virulencia

Klebsiella pneumoniae es una bacteria que ocasiona neumonía, septicemia, infecciones de heridas quirúrgicas y de vías urinarias, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (Lee C-R *et al.*, 2017).

K. pneumoniae emplea diversas estrategias para crecer y protegerse de la respuesta inmune del huésped (Cortes *et al.*, 2002).

La patogenicidad de *K. pneumoniae* se debe a que posee una gran cantidad de factores de virulencia, que incluyen, adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, protectinas y toxinas (Paczosa y Meccas, 2016; Peleg y Hooper, 2010).

Adhesinas

La patogenicidad de *K. pneumoniae* se debe a los diferentes factores de virulencia que posee, entre los que se encuentran los genes de adhesión *mrkD* (type 3 fimbriae) y *rmpA* (regulator of mucoid phenotype A), (Ranjbar *et al.*, 2016).

La fimbria tipo 1 (codificada por el gen *fim*) y la fimbria tipo 3 (codificada por el gen *mrkD*) son estructuras adhesivas que participan en la colonización y desarrollo de la infección, las fimbrias tipo 1 son protrusiones de la superficie bacteriana (Stahlhut *et al.*, 2009; Klemm *et al.*, 2000), mientras que las fimbrias tipo 3 son estructuras con forma de hélice y se encuentran bajo el control genético del operón *mrkABCD* (Tarkannen *et al.*, 1998). Se ha descrito que la fimbria tipo 3 codificada por el gen (*mrkD*) juega un papel importante en las infecciones del tracto urinario y en la neumonía (Ikeda *et al.*, 2018). Se ha descrito que la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* son portadoras de *mrkD*, lo que demuestra que la formación de biopelícula está relacionada con la presencia de este gen (Surgers *et al.*, 2018).

Durante infecciones secundarias, las superficies epiteliales despojadas y exfoliadas pueden exponer los receptores de colágeno que ocasionan la adherencia de la fimbria tipo 3 codificada por el gen *mrkD* perteneciente a *K. pneumoniae*. El crecimiento en estos sitios en forma de biopelículas le permite a la bacteria sobrevivir al ataque por macrófagos alveolares, cuando infectan los pulmones. Para los pacientes con tubos endotraqueales la fimbria de tipo 3 puede tener un rol dual en el proceso de infección. Inmediatamente después de la inserción de estos dispositivos, la naturaleza hidrofóbica de las fimbrias tipo 3

puede facilitar la adhesión a las superficies del polímero, como consecuencia tiene el crecimiento de las bacterias en los dispositivos. Por lo que un papel secundario de la fimbria tipo 3 en este tipo de infecciones puede involucrar una interacción específica del receptor que son proteínas de matriz extracelular como colágenas tipo IV y que se asocia con la presencia del gen *mrkD* (Jagnow y Clegg, 2003).

De acuerdo con Schroll la fimbria tipo 3 pero no el tipo 1 induce la formación de biopelícula en *K. pneumoniae* C3091. La fimbria tipo 3 promueve la adhesión a superficies abióticas, así como la formación de biopelículas en otras especies, puede jugar un papel importante en el desarrollo de las infecciones relacionadas con los catéteres. Cabe mencionar que la fimbria tipo 3 se adquiere mediante plásmidos conjugativos para esta y otras especies (Schroll *et al.*, 2010).

La Poli-N-acetil-glucosamina (PNAG) es un componente esencial en la matriz de la biopelícula en bacterias filogenéticamente diferentes. *PgaABCD* codifica la síntesis y producción de poli- β -enlazado a N-acetilglucosamina (PNAG) en un limitado número de especies bacterianas. La pérdida de *pgaC* en *K. pneumoniae* afecta la producción de PNAG. La participación del polisacárido N-Acetilglucosamida (PNAG) en la formación de biopelícula *in vitro* de *K. pneumoniae* fue significativa sobre la adición de sales biliares en una alta concentración. En el modelo de ratón, Δ *pgaC* perdió su capacidad para colonizar el intestino, para propagarse a órganos extra intestinales, y para desarrollar una infección sistémica. En este estudio se demostró que *pgaC* participó en la formación de biopelícula inducida por la presencia de sales biliares y fue requerido por *K. pneumoniae* en la virulencia *in vivo* (Chen *et al.*, 2014).

Las cepas de *K. pneumoniae* capaces de producir una biopelícula fuerte tienen una frecuencia mayor de genes de adhesión, por ejemplo, se ha descrito que las cepas que producen una biopelícula moderada o fuerte son portadoras de los genes *mrkA*, *mrkD* (fimbrial protein type A, D) y del gen *rmpA* (*regulator of mucooid phenotype A*) (Bakhtiari *et al.*, 2021), y por consiguiente la biopelícula protege a la bacteria contra la acción de los antibióticos.

Sistemas de adquisición de hierro, sideróforos

Las bacterias producen un grupo de proteínas con un quelante para la obtención de hierro llamados sideróforos, que de acuerdo con el grupo funcional quelante de hierro, se clasifican en catecolatos (con un grupo funcional catecol), hidroximatos (grupo funcional hidroxámico), e hidroxicarboxilatos (grupo funcional hidroxicarboxílico), (Crosa, Walsh, 2002). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (400-1000 kDa) con una gran afinidad por el hierro (Neilands, 1981; Raymond y Dertz, 2004; Skaar, 2010).

Los sideróforos son capaces de formar enlaces con metales pesados que no son hierro, pero esto tiene desventajas y ventajas para la bacteria. Los sideróforos forman enlaces con metales pesados para desintoxicar su entorno. Aun así, es incierto como la bacteria evita el transporte del complejo metal-sideróforo dentro de la célula. Adicionalmente los sideróforos pueden actuar como toxinas y como inmuno moduladores, pero no es claro si la activación de rutas del hospedero como la expresión regulada por HIF-1 α (subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia) es benéfica para el huésped o para la bacteria. Se ha demostrado que cepas que producen ciertos tipos de sideróforos han potenciado su virulencia, tal es el caso de *K. pneumoniae* con las cepas que secretan Aer. Se presumía que eran moléculas redundantes al formar enlaces con hierro, es cada vez más evidente que los sideróforos individuales pueden tener un papel específico al evadir Lcn2 (lipocalina 2), al enlazar con iones metálicos distintos del hierro, iniciando o inhibiendo rutas celulares del hospedero y determinando el nicho replicativo durante la infección (Holden y Bachman, 2015).

Bajo condiciones de hierro limitado *in vitro*, el locus de enterobactina se expresa mucho más que el locus de yersiniabactina y un mutante isogénico de enterobactina muestra un crecimiento más lento que un mutante de yersiniabactina. Interesantemente, la cepa doble mutante crece mucho más lento que el mutante de enterobactina en una baja concentración de quelante de hierro, sugiriendo que la yersiniabactina puede ser en menor medida, pero no menos importante un recolector de hierro en estas condiciones. De cualquier manera, en una alta concentración de quelante de hierro, el mutante de enterobactina crece tan pobremente como el doble mutante. Por lo que la enterobactina parece tener un papel importante en la captación de hierro bajo

unas condiciones muy restrictivas de este elemento. El gen que codifica el receptor de yersiniabactina, *psn*, se expresó mucho más en un mutante de enterobactina que en la cepa de tipo silvestre. Estos resultados muestran que existe la posibilidad que los sideróforos de no enterobactina son seleccionados durante la infección y esta presión selectiva se debe a la preferencia de la fuente de adquisición de hierro y a las respuestas inmunes innatas presentes. Se muestra una relación inversa entre la yersiniabactina y la enterobactina, que depende de las condiciones de crecimiento. *In vitro*, la enterobactina es más importante que la yersiniabactina bajo condiciones limitadas de hierro, mientras que *in vivo* la yersiniabactina actúa de manera más importante. Se sugiere que la adquisición de un sideróforo en adición al sistema de enterobactina, que podría ser yersiniabactina o aerobactina, pueden ser un factor determinante al mejorar la virulencia de *K. pneumoniae* (Lawlor *et al.*, 2007).

Las cepas que codifican para yersiniabactina (*Ybt*) están asociadas con un alto riesgo de desarrollar una infección respiratoria. La yersiniabactina confiere la habilidad para evadir a lipocalina 2 (Lcn2) en los pulmones y causar eficientemente neumonía, la función de la yersiniabactina está especializada para promover el crecimiento en los pulmones, pero no en el suero. Las cepas que codifican enterobactina son patógenos oportunistas que causan una enfermedad severa en la ausencia de la lipocalina 2 (Lcn2) (Bachman *et al.*, 2011).

Protectinas

El fenotipo de hipermucoviscosidad de *K. pneumoniae* (hvKP) se debe al aumento en la producción del polisacárido capsular y la presencia de genes de virulencia específicos como *magA* (mucoviscosity-associated gene A) específico del serotipo capsular K1, y *rpmA* (regulator of mucoid phenotype A) (Siu *et al.*, 2011; Paczosa y Mecsas, 2016).

La cápsula es una red de polisacáridos que envuelve a la célula, es necesaria para la virulencia de *K. pneumoniae* y es el factor de virulencia más estudiado para esta especie (Podschun *et al.*, 1998; Lawlor *et al.*, 2006). De esta manera las cepas portadoras de estos genes producen una hiper cápsula que consiste en un exopolisacárido bacteriano mucoviscoso que es más robusto que la típica

cápsula. Esta hipercápsula puede contribuir significativamente a la patogenicidad de las cepas de *K. pneumoniae* (Yu *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2007).

En *Klebsiella pneumoniae* se han identificado 77 antígenos K presentes en la cápsula, sin embargo, sólo se han reconocido 9 diferentes antígenos tipo O, de los cuales el O1 es el más común (Hansen *et al.*, 1999).

De los diferentes serotipos capsulares (K) de *K. pneumoniae*, dos serotipos capsulares (K1 y K2) se han relacionado frecuentemente a la virulencia, y se ha demostrado que las cepas pertenecientes a estos serotipos (K1/K2) son más virulentas, debido a que generalmente son altamente resistentes a la fagocitosis (Lin *et al.*, 2010; Mizuta *et al.*, 1983; Yu *et al.*, 2008).

Otro factor de virulencia importante es el LPS, conocido como lipopolisacárido o endotoxina, que es un componente importante y necesario de la parte más externa de la membrana de todas las bacterias Gram negativas. A pesar de existir una variación considerable en la estructura del LPS entre las especies de bacterias, principalmente se compone de: antígeno O, un núcleo de oligosacárido, y el lípido A. Estos componentes son codificados por los clústeres de genes *wb*, *waa* y *lpx* (De Majumdar *et al.*, 2015; Fridrich *et al.*, 2005; Merino *et al.*, 2000; Raetz *et al.*, 2009).

El LPS puede ser una ventaja y un obstáculo a la vez para *K. pneumoniae* debido a que funciona como una protección ante las defensas del huésped, pero también puede ser un fuerte activador del sistema inmune. La porción lipídica del LPS, el lípido A, es conocido por ser un potente ligando de TLR4 (receptor de linfocitos T 4), un receptor que, si es estimulado, como consecuencia lleva a la producción de citocinas y quimocinas que ayudan a reclutar y activar respuestas celulares, incluyendo neutrófilos y macrófagos, que se encargan de eliminar la infección ocasionada por *K. pneumoniae* y controlar su dispersión hacia otros tejidos (Cai *et al.*, 2009; Standiford *et al.*, 2012; Branger *et al.*, 2004).

Toxinas

Las bacterias patógenas secretan toxinas que pueden tener efectos citotóxicos en las células del hospedero (Ménétreay *et al.*, 2005). La colibactina es una genotoxina híbrida policétido-polipéptido, estudiada por primera vez en *E. coli* (Nougayrede *et al.*, 2006). La colibactina pertenece junto con los factores

necrotizantes citotóxicos (CNFs), como la toxina citoletal de distensión (CDT) y el factor inhibitorio del ciclo (CIF), a las ciclomodulinas que pueden regular la diferenciación, apoptosis y proliferación celular (El-Aouar Filho *et al.*, 2017).

En *K. pneumoniae* se han descrito algunas toxinas, como; *hlyA* (α -haemolysin) y *cnf-1* (cytotoxic necrotizing factor-1) (El Fertas *et al.*, 2013). La hemolisina tiene la habilidad de provocar la lisis de los eritrocitos (Braun y Focareta,1991). Por muchos años *K. pneumoniae* fue considerada como no hemolítica, pero en 1985 Albert y colaboradores demostraron que cepas clínicas de *K. pneumoniae* mostraron actividad hemolítica en células rojas de conejo (Albesa *et al.*,1985). Estudios posteriores han demostrado que la hemolisina purificada de *K. pneumoniae* (klebsolisina) posee actividad hemolítica en células sanguíneas rojas en ovejas, ratones, y humanos, además tiene características similares de otras lisinas (Albesa1989; Barberis *et al.*,1986).

Descripción del genoma de *Klebsiella pneumoniae*

Dentro de las especies bacterianas, hay típicamente un conjunto de genes que se conservan entre todos los miembros. Este conjunto de genes es considerado como el pangenoma. En *K. pneumoniae* el pangenoma, está presente en más del 95% de las cepas, se estima que contiene aproximadamente 2000 genes (Holt *et al.*, 2015). Los genes que varían entre cepas son denominados como genoma accesorio. Estos genes pueden hallarse en el cromosoma y en plásmidos. Debido que el genoma de *K. pneumoniae* está estructurado de 5000 a 6000 genes, esto quiere decir una gran parte de su genoma está compuesto por el genoma accesorio (2000 genes), los cuales pueden ayudar a procesos específicos como lo es la fijación de nitrógeno (Fouts *et al.*, 2008). También pueden codificar enzimas de resistencia a los antibióticos (Bi *et al.*, 2015). Los genes accesorios pueden ser adquiridos mediante transferencia horizontal de entre especies bacterianas, muestra de ello es la presencia de islas genómicas y elementos genéticos móviles. Los genes codificados en islas genómicas pueden ayudar a las cepas a adaptarse a sitios específicos, desarrollar la infección y colonización (Chen *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; van Aartsen *et al.*, 2012).

Lery y colaboradores realizaron un análisis comparativo de la secuencia completa del genoma de una cepa de *K. pneumoniae* con una virulencia alta denominada Kp52.145, un derivado de K2 cepa de referencia B5055. Se revelaron cinco regiones genómicas posiblemente involucradas en la virulencia bacteriana. Se demostró que el gen *pld1* está relacionado con la virulencia en el modelo de neumonía en el ratón y reveló una nueva implicación del metabolismo de lípidos en la patogénesis de *K. pneumoniae* (Lery *et al.*, 2014).

En la figura 2 se representa el genoma de *K. pneumoniae*

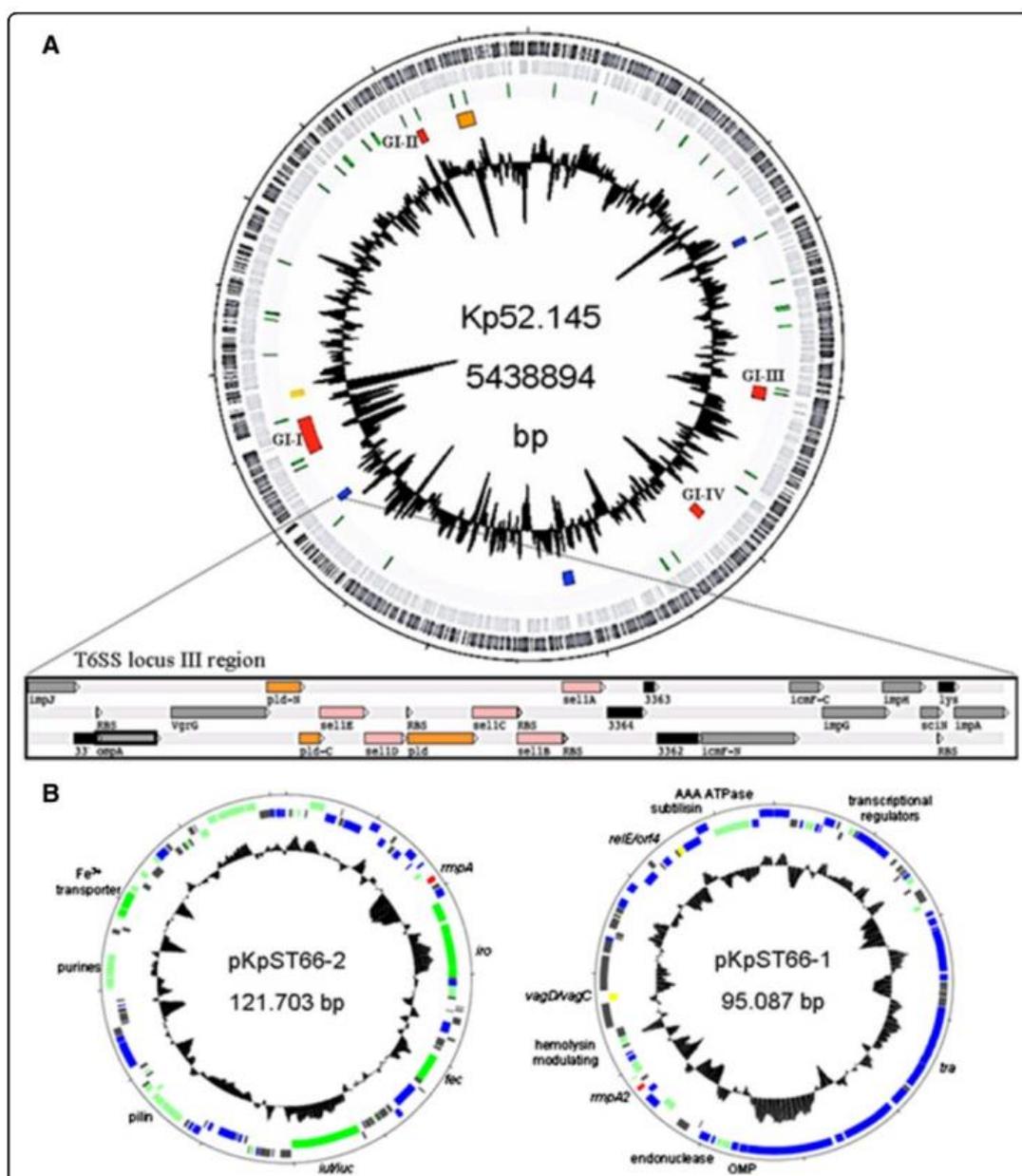


Figura 2. Genoma de *K. pneumoniae* Kp52.145. A) Representación del cromosoma:

Las capas exteriores en gris indican la posición de las CDSs de las cadenas positivas y negativas. Los ARNt están representados en verde, mientras que las cuatro islas genómicas (GI) relacionadas con la virulencia están en rojo, el locus que codifica el metabolismo anaeróbico en naranja, los grupos de genes T6SS en azul y la región de síntesis capsular en amarillo. El círculo interior representa el G + C%.

El detalle de la región del locus III de la T6SS que contiene los genes putativos de la fosfolipasa (gen *pld1*) (naranja) y *sel1* (rosa) se muestra ampliado.

B) Representación de los plásmidos: los genes de mantenimiento del plásmido y las secuencias de inserción (IS) se muestran en azul, las proteínas con funciones desconocidas en gris, funciones conocidas en verde, sistemas de toxina-antitoxina en amarillo y *rmpA* en rojo. CDSs, secuencias codificantes (Tomado de Lery *et al.*, 2014).

Resistencia a los antibióticos

El tratamiento de las infecciones por *K. pneumoniae* se ha complicado debido a que las cepas se han seleccionado como resistentes a diferentes grupos de antibióticos, entre ellos a los betalactámicos. La resistencia bacteriana a los betalactámicos se debe a la producción de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) (Magiorakos *et al.*, 2011). Entre los genes que codifican para ESBL se encuentran *blaTEM* (contracción de Temoneira enzyme), y *blaSHV* (sulfhidrido variable).

Existen varios factores que contribuyen a la selección de cepas resistentes, como la transferencia horizontal de genes de resistencia mediante plásmidos, transposones e integrones (Ferreira *et al.*, 2019).

La selección de bacterias resistentes a los antibióticos en hospitales puede fácilmente elevar la mortalidad, por lo que es importante la determinación del fenotipo de resistencia a los antibióticos para la prescripción adecuada del tratamiento, sobre todo en hospitales (Azimi *et al.*, 2019).

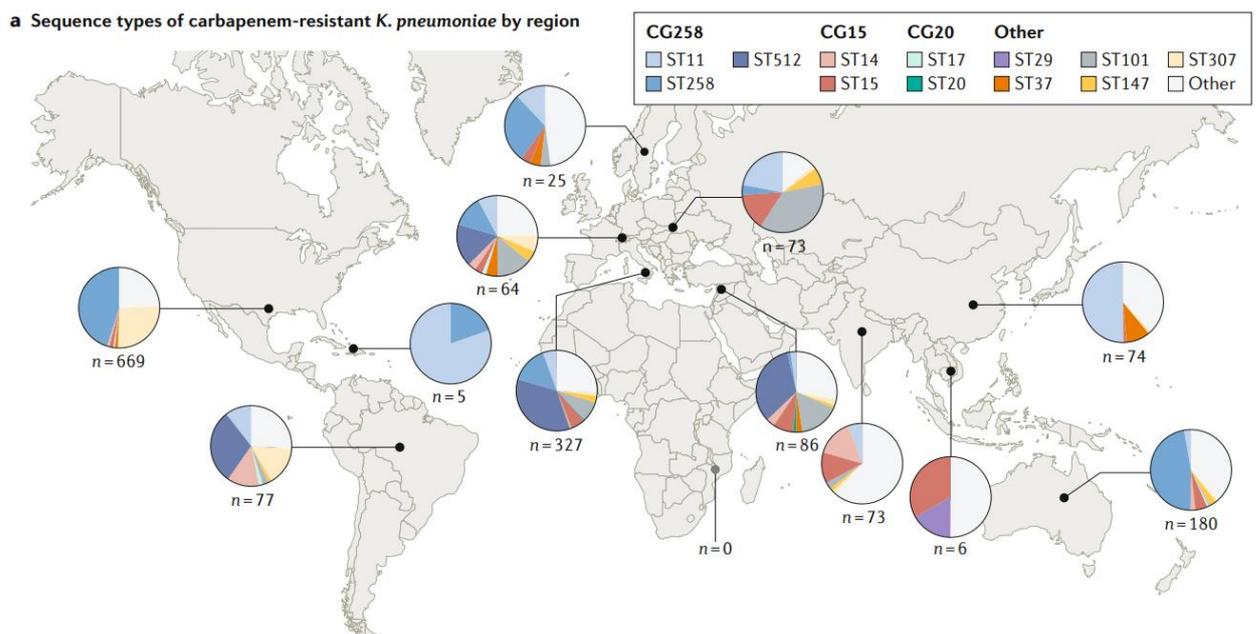
En un estudio reciente se describió que el 40% de las cepas de *K. pneumoniae* presentó una elevada resistencia a los antibióticos betalactámicos, cefalosporinas y ciprofloxacino, y trimetoprim/sulfametoxazol, y una resistencia moderada a la piperacilina/tazobactam (Miranda-Novales *et al.*, 2020).

Los microorganismos que presentan resistencia a los antibióticos son un problema de salud pública mundial, es difícil controlar y tratar enfermedades de carácter bacteriano, como consecuencia se observa una morbilidad y mortalidad

mayor. La resistencia a los antibióticos ocurre mediante 4 diferentes mecanismos genéticos (Starost., 2018):

1. Transformación; transferencia de ADN libre en el medio extracelular debido a la lisis bacteriana.
2. Transducción; Un bacteriófago lleva a cabo la transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra.
3. Transposición; Un transposón es un elemento de DNA móvil, que puede transponerse del cromosoma a plásmidos y puede acarrear genes de resistencia a los antibióticos.
4. Conjugación; El intercambio de material genético puede desarrollarse a través del pili sexual entre dos bacterias, donante y receptor (Abreu *et al.*, 2011; Cabrera *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2009).

La elevada resistencia de las cepas de *K. pneumoniae* a los antibióticos, principalmente a los carbapenemes y cefalosporinas de tercera generación es un gran problema de salud (Figura 3).



b Sequence types of third-generation cephalosporin-resistant, carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* by region

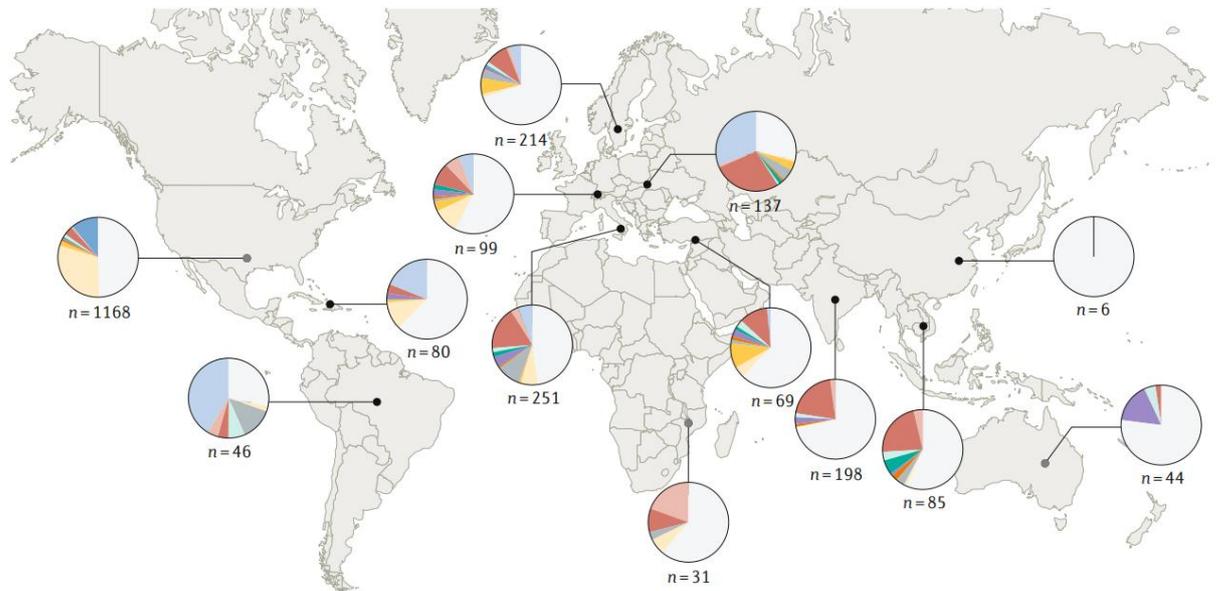


Figura 3. Distribución geográfica de las cepas de *K. pneumoniae* con resistencia a los a) carbapenemes y b) cefalosporinas de tercera generación (Wyres *et al.*, 2020).

Generalidades de antibióticos

El origen de la palabra antibiótico se remonta a 1890 gracias a Paul Vuillemin, quien acuñó el término antibiosis como un antónimo de la simbiosis para describir la relación antagónica entre los microorganismos. Más tarde, la palabra antibiótico se utilizó para describir los metabolitos secundarios naturales producidos por bacterias y hongos que poseen actividades inhibitoras del crecimiento (bacteriostáticas) o de muerte (bactericida) contra bacterias u hongos. El primer antibiótico descrito de la naturaleza fue el ácido micofenólico, fue descrito por el italiano Bartolomeo Gosio en 1893. (Vuillemin.,1890; Bentley y Bennett, 2003).

En 1947. Waksman definió el término antibiótico como sigue: “un antibiótico es una sustancia química, producida por microorganismos, que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento e incluso destruir bacterias y otros microorganismos”. (Waksman,1947).

Los antibióticos hoy en día se agrupan en diferentes familias dependiendo su mecanismo de acción (Cuadro 1).

ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	MECANISMO DE RESISTENCIA
1. β-LACTÁMICOS <ul style="list-style-type: none"> ● PENICILINAS ● CEFALOSPORINAS ● CARBAPANEMES ● MONOBACTÁMICOS ● SULBACTAM Y ÁC CLAVULÁNICO 	INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR (EL PEPTIDOGLUCANO)	1 PRODUCCIÓN DE β-LACTAMASAS (<i>blaSHV</i>, y <i>TEM</i>) 2. MUTACIÓN DE PBP_s 3. BAJA PENETRACIÓN
2. POLIPÉPTIDOS : BACITRACINA POLIMIXINA B, COLISTINA	ALTERACIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR DE G - , ACCIÓN DETERGENTE	BAJA PENETRACIÓN MUTACIÓN DEL POLISCÁRIDO
3. AMINOGLUCÓSIDOS ESTREPTOMICINA GENTAMICINA NEOMICINA KANAMICINA	INHIBEN SÍNTESIS DE PROTEÍNAS AL UNIRSE/ SUBUNIDAD RIBOSOMAL 30 S	1. MUTACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN EN EL RIBOSOMA 2. BAJA PENETRACIÓN 3. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA (ACETILACIÓN, FOSFORILACIÓN) <i>aac(3)I-IV</i> (GE), <i>aadA</i> (estreptomicina)
4. TETRACICLINAS	INHIBEN SÍNTESIS DE PROTEÍNAS AL UNIRSE/ SUBUNIDAD RIBOSOMAL 30 S	1. DESTOXIFICACIÓN ENZIMÁTICA (<i>teA</i> y <i>tetB</i>) 2. BAJA PENETRACIÓN
5. CLORANFENICOL	INHIBEN SÍNTESIS DE PROTEÍNAS AL UNIRSE / SUBUNIDAD RIBOSOMAL 50 S	1. MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA (<i>cat1</i> y <i>cmlA</i>) (ACETILTRANSFERASA)
6. MACRÓLIDOS ERITROMICINA , LINCOMICINA, CLINDAMICINA, CLARITROMICINA	INHIBEN SÍNTESIS DE PROTEÍNAS AL UNIRSE / SUBUNIDAD RIBOSOMAL 50 S	1. MUTACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN EN EL RIBOSOMA
7. QUINOLONAS AC. NALIDÍXICO, PEFLOXACINA, NORFLOXACINA, CIPROFLOXACINA	INHIBEN ACTIVIDAD DE LA DNA GIRASA AFECTANDO REPLICACIÓN DEL DNA	1. MUTACIÓN DE LA SUBUNIDAD ALFA DE LA ADN GIRASA (<i>qnr</i>) 2. DISMINUCIÓN DE LA CAPTACIÓN
8. RIFAMPICINA, RIFABUTINA	ACTÚAN SOBRE LA RNA POLIMERASA, INHIBIENDO LA TRANSCRIPCIÓN	1. MUTACIÓN DE LA RNA POLIMERASA
9. SULFONAMIDAS Y TRIMETOPRIM	INHIBEN SÍNTESIS DEL ÁC FÓLICO QUE PARTICIPA EN SINT. PURINAS	1. SÍNTESIS DE VÍA ALTERNA NO SENSIBLE AL FÁRMACO (<i>sul</i> y <i>dfrA</i>)

Cuadro1. Clasificación de los antibióticos, mecanismo de acción y mecanismo de resistencia bacteriana (Adaptado y mejorado de Madigan y Martinko, 2006).

Beta lactámicos

Actividad antimicrobiana

Las penicilinas son agentes naturales o sintéticos derivados de los hongos. Todas las penicilinas comparten tres componentes químicos básicos, un anillo de thiazolidina, un anillo beta lactámico y una cadena lateral. Inhiben la síntesis de la pared celular al unirse a las enzimas que producen las proteínas de la pared celular (Miller, 2002).

Las cefalosporinas son un grupo diverso y extremadamente eficaz de los antibióticos beta lactámicos, comparten mecanismos de acción y tienen una estructura semejante a la penicilina, presentan actividad contra organismos Gramnegativos comunes como *Escherichia coli*. (Harrison y Bratcher, 2008).

Los monobactámicos, ejemplificados por el producto natural sulfacezín, son la única clase de antibióticos beta lactámicos que no son inactivados por las metalo beta lactamasas, las cuales confieren a las bacterias un amplio espectro de resistencia a los betalactámicos. (Li *et al.*, 2017).

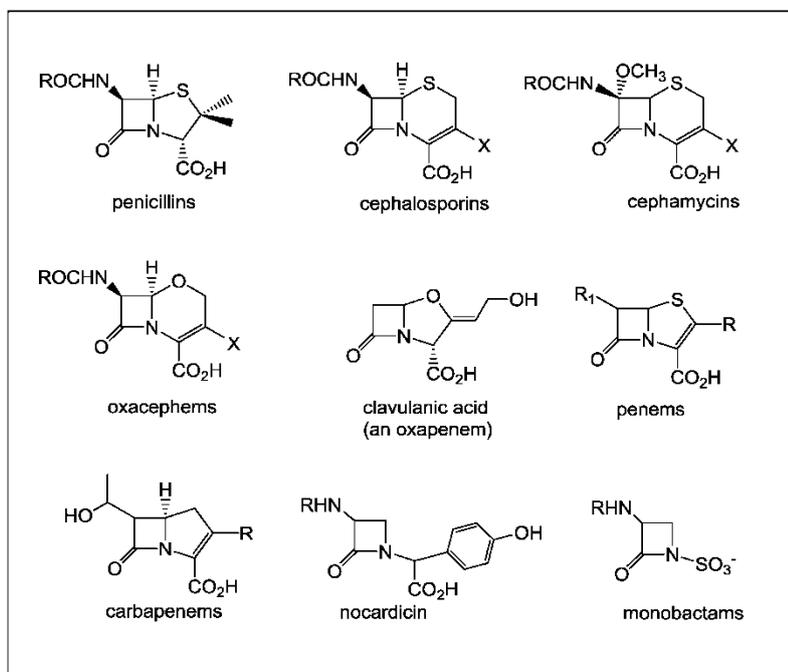


Figura 4. Estructura de los antibióticos beta lactámicos (Konaklieva, 2014).

Mecanismo de acción

La penicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, es decir, la inhibición de la reacción de transpeptidación de la síntesis del peptidoglicano. En la biosíntesis del peptidoglicano intervienen unas 30 enzimas bacterianas y puede considerarse en 3 etapas.

En la primera etapa, que tiene lugar en el citoplasma, el producto Uridina difosfato (UDP)-acetilmuramil-pentapéptido se acumula en las células cuando se inhiben las etapas sintéticas posteriores. La última reacción en la síntesis de este compuesto es la adición de un dipéptido, la D-anilil D-alanina. La síntesis del dipéptido implica la racemización previa de la L-alanina y la condensación catalizada por la D-alanil-D-alanina sintetasa. Durante las reacciones de la segunda etapa, el UDP-acetilmuramil-pentapéptido y el UDP-acetilglucosamina se unen, con la liberación de nucleótidos de uridina, para formar un polímero largo. En la tercera etapa, la reacción de transpeptidación se produce fuera de la membrana celular, aunque la propia transpeptidasa está unida a la membrana. El residuo terminal de glicina del puente de pentaglicina se une al cuarto residuo del pentapéptido (D-alanina), liberando el quinto residuo (también D-alanina). Es este último paso en la síntesis del peptidoglicano el que es inhibido por los antibióticos beta-lactámicos. Los modelos estereoscópicos revelan que la conformación de la penicilina es muy similar a la de la D-anilil-D-alanina (Waxman *et al.*,1980; Kelly *et al.*,1982).

La transpeptidasa es probablemente acilada por la penicilina, es decir, la enzima penicilloil se forma con la escisión del enlace -CO-N- del anillo beta lactámico (Mandell y Petri,1996).

Los objetivos de la acción de las penicilinas y las cefalosporinas se denominan colectivamente proteínas de unión a la penicilina (PBP) (Spratt, 1980; Ghuysen, 1991).

Resistencia antimicrobiana

La resistencia bacteriana es un aspecto natural de la evolución de las bacterias que puede resultar de mutaciones o de genes externos, es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico y como proceso

evolutivo se produce por selección natural a través de mutaciones al azar (Bustos *et al.*, 2017).

La resistencia bacteriana a los betalactámicos ha comprometido históricamente el uso de estos agentes en el tratamiento de enfermedades infecciosas y sigue haciéndolo, por lo que es necesario el desarrollo continuo de nuevos beta lactámicos capaces de superar esta resistencia.

Debido a su amplio espectro de actividad y a su potencial de propagación, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las AmpC y las metalo betalactamasas asociadas a plásmidos o integrones son motivo de especial preocupación. Con un uso adecuado y un seguimiento de la resistencia, los betalactámicos seguirán desempeñando un papel esencial en la quimioterapia antimicrobiana (Poole, 2004).

Mecanismos de resistencia

En la actualidad, es habitual que una bacteria tenga varios genes de resistencia diferentes que funcionan de forma conjunta para conferirle una resistencia de amplio espectro. Los tres mecanismos principales de la resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos son (i) la degradación enzimática por parte de las β -lactamasas, (ii) la modificación del receptor de las PBP que da lugar a una falta de unión a los β -lactámicos, y (iii) la regulación de la entrada y el flujo de β -lactámicos.

Degradación enzimática

El mecanismo más destacado de resistencia bacteriana a los β -lactámicos es la expresión de enzimas hidrolíticas denominadas β -lactamasas. Estas enzimas reconocen e hidrolizan específicamente el anillo β -lactámico de cuatro miembros, dando lugar a un producto inactivado que ya no es eficaz para inhibir las transpeptidasas. Lo más frecuente es que la resistencia se confiera por la mutación de las enzimas β -lactamasas preexistentes, lo que da lugar a un espectro mejorado o a una especificidad de sus propiedades hidrolíticas contra las diversas clases de β -lactamasas. Muchas β -lactamasas están codificadas en elementos genéticos móviles, lo que ha incrementado su transmisión y propagación, de manera que ahora es común encontrar cepas bacterianas que

albergan hasta ocho β -lactamasas diferentes, cada una de ellas adaptada para inactivar un subconjunto único de antibióticos. Las β -lactamasas mismas se agrupan normalmente en cuatro clases distintas basadas en la similitud de la secuencia de ADN (clases moleculares A-D). Las clases moleculares A, C y D evolucionaron a partir de las transpeptidasas y utilizan una serina en el sitio activo para iniciar la hidrólisis del enlace, por lo que se denominan β -lactamasas de serina (SBL). Por el contrario, las enzimas moleculares únicas de clase B son las β -lactamasas metálicas (MBL) que utilizan iones de zinc en el sitio activo para coordinar un hidróxido nucleófilo para mediar en la apertura del anillo. Las enzimas de clase B se clasifican a su vez en las subclases B1, B2 y B3 basándose en las similitudes de la secuencia del ADN. En conjunto, estas enzimas son capaces de hidrolizar todas las β -lactamasas clínicamente disponibles (Bush, 2013).

Clasificación de las β -lactamasas.

Clase A SBLs (betalactamasas de serina)

La penicililasa de clase A TEM (Temoneira enzyme) fue la primer betalactamasa descubierta, codificada en un plásmido en las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Salmonella enterica*) en los años 1960s (Bush, 2012). A finales de los 1970s y principios de los 1980s, las enzimas de amplio espectro TEM (Temoneira) y SHV (sulfhidrilo variable) fueron las betalactamasas más comunes codificadas por plásmidos en cepas de bacterias Gramnegativas. Debido a su abundancia y ubicación en elementos genéticos móviles propiciaron un ambiente para la evolución de estas enzimas en respuesta a la introducción de nuevos antibióticos betalactámicos (Turner, 2005). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) de clase A y pertenecientes a las familias TEM (Temoneira), SHV (sulfhidrilo variable) y CTX-M (Cefotaxima) son actualmente las betalactamasas más significantes hablando clínicamente y han evolucionado, no sólo para hidrolizar las penicilinas sino también cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos (Bush, 2012). Hoy en día la familia CTX-M de la clase A es la más prominente de las betalactamasas de espectro extendido a escala global, y tiene la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro como la cefotaxima (Delmas *et al.*, 2010).

Clase B MBLs (metalo-betalactamasas)

La primera enzima de clase B descubierta fue la metalo-betalactamasa (MBL) BclI de *Bacillus cereus* en 1966 por Sabath y Abraham (Sabath y Abraham, 1966). Para 1989, solo 4 enzimas MBL habían sido descubiertas y aparentemente parecían estar codificadas por plásmidos y ser específicas para cada especie. En las siguientes dos décadas, las metalo-betalactamasas (MBLs) fueron vistas como interesantes, pero clínicamente insignificantes. Sin embargo, en 1991 el descubrimiento de IMP-1 codificada por un plásmido de *Pseudomonas aeruginosa* en Japón desencadenó una carrera por el descubrimiento de nuevas metalo-betalactamasas (MBLs) (Bebrone, 2007).

Las metalo-betalactamasas son conocidas por su habilidad de hidrolizar casi todos los betalactámicos, a excepción de los monobactámicos. Además, las MBLs constituyen la clase molecular más diversa de carbapenemasas (Walsh, 2010).

NDM (metalo-betalactamasa de Nueva Delhi) puede conferir a *K. pneumoniae* de una gran resistencia a todos los betalactámicos incluyendo los carbapenemes (Yong *et al.*, 2009).

Clase C SBLs (betalactamasas de serina)

La clase C de betalactamasas o enzimas AmpC originalmente evolucionaron para hidrolizar cefalosporinas. Sin embargo, en la actualidad muchas de estas enzimas tienen una alta eficiencia catalítica hacia las penicilinas. Estas enzimas típicamente son codificadas por plásmidos y con frecuencia bajo expresión inducible. Por otro lado, muchas enzimas de la clase C han sido encontradas en un número alto de copias en plásmidos móviles (Philippon *et al.*, 2002). La clase C de enzimas son comúnmente halladas en bacterias Gramnegativas como *E. coli* y *K. pneumoniae* (Fenollar-Ferrer *et al.*, 2008). Típicamente, las enzimas AmpC no son susceptibles a los inhibidores de las betalactamasas, sin embargo, algunas si son susceptibles al sulbactam y tazobactam (Jacoby, 2009).

Clase D SBLs (betalactamasas de serina)

La clase D de betalactamasas es la clase con más divergencias estructurales dentro de las subclases de SBL (betalactamasas de serina), y la similitud en la secuencia de ADN con las clases A y C se restringe a distintas regiones de sitios

activos. Estas betalactamasas son mejor conocidas como enzimas OXA, nombradas de esta manera debido a su habilidad para hidrolizar la oxacilina.

Los genes de clase D son codificados en plásmidos y están localizados en casetes de genes en regiones de un integrón. Similares a la clase A de enzimas, las betalactamasas de clase D fueron designadas originalmente como penicilinasas, que después evolucionaron la habilidad de hidrolizar un subconjunto de cefalosporinas y carbapenemes (Majiduddin *et al.*, 2002).

Muchas enzimas de clase D SBLs (betalactamasas de serina) han sido encontradas al existir como un dímero en solución, y el equilibrio dímero-monómero parece ser un factor importante en la cinética de la hidrólisis de los betalactámicos (Paetzel *et al.*, 2000; Vercheval *et al.*, 2010). Esta clase emergente de enzimas no puede ser eficientemente inhibida por ningún inhibidor de betalactamasas (Szarecka *et al.*, 2011).

Mecanismo de las β -lactamasas.

Clase A SBLs (betalactamasas de serina)

El sitio activo de las betalactamasas de clase A contiene cuatro distintos motivos que son importantes para la unión del sustrato y la catálisis, (I) S70XXK, (II) S130XN, (III) K234 T/SG, y (IV) el bucle Ω . El mecanismo general de la hidrólisis de las betalactamasas tiene inicio con la activación de S70 por desprotonación. Actualmente hay dos mecanismos propuestos para la activación de S70: K73 actúa como una base para desprotonar al catalítico S70 (Swaren *et al.*, 1995; Strynadka *et al.*, 1992), y E166 activa una molécula de agua que desprotona a S70 (Hermann *et al.*, 2005). Una vez activa, S70 ataca el enlace amida betalactámico que resulta en la formación de un intermediario tetraédrico que es estabilizado por el agujero oxianiónico de la enzima (Strynadka *et al.*, 1996). Después, el intermediario tetraédrico se rompe para expulsar el grupo N4, que consecuentemente es protonado por S130 resultando en la formación del transitorio intermediario acil-enzima. Se especula que K73 dona un protón a S130 para dejar un grupo de protonación en el proceso. La deacilación generalmente ocurre a través de la activación de una molécula nucleofílica de agua por E166, resultando en la hidrólisis del enlace acil con una donación de

un protón, por un transporte sistemático vía K73, hacia el sitio catalítico de S70 y la liberación del producto inactivado del sitio activo (Hermann *et al.*, 2005).

Clase B MBLs (metalo-betalactamasas)

A pesar de tener una divergencia en sus secuencias, las MBL (metalo-betalactamasas) tienen pliegues muy conservados que las caracterizan, están conformados por un β -sándwich interno flanqueado en su cara externa por cinco α -hélices. El zinc que contiene el sitio activo se localiza en una cara del β -sándwich (King y Strynadka, 2012).

Las metalo-betalactamasas (MBLs) pueden ser monovalentes o bivalentes dependiendo de la subclase. Las enzimas de las subclases B1 y B3 utilizan un centro bivalente de zinc para mediar la hidrólisis, mientras que las enzimas que pertenecen a la subclase B2 son monovalentes y son inhibidas por la presencia de un segundo sitio activo de ion zinc y muestran una alta especificidad para la hidrólisis de carbapenemes (Bebrone *et al.*, 2009; Hernandez Valladares *et al.*, 1997).

En el caso de las subclases de MBLs B1 y B3, el carbonilo betalactámico es coordinado por el Zn1 en el complejo precatalítico. El C3 del carboxilato del sustrato interactúa electrostáticamente con K224. El enlace por los iones zinc electro positivos mantiene el puente catalítico de hidróxido a un pKa de 5-6 (Wang *et al.*, 1999). El ataque nucleofílico por este hidróxido en el carbonilo activado, resulta en la formación de un intermediario tetraédrico, el cuál es estabilizado por un posible agujero oxianion (que está formado por Zn1y la cadena lateral amida de nitrógeno N220). Entonces el intermediario tetraédrico se disocia para expulsar al nitrógeno cargado negativamente, el cual se propone que es protonado por un solvente. El producto es liberado del sitio activo, y el hidróxido nucleofílico es recargado entre los iones zinc para otra ronda de catálisis (Page y Badarau, 2008).

Clase C SBLs (betalactamasas de serina)

Los cuatro motivos de sitios activos que definen a la clase C de enzimas son (I) S644XXK, (II) Y150AN, (III) K314TG y (IV) el bucle Ω . El bucle Ω ocupa una posición única en comparación de la clase A de enzimas, dejando espacio para más cadenas laterales del betalactámico cefalosporina (Jacoby, 2009). El

mecanismo general de la catálisis de las betalactamasas AmpC es muy similar al mecanismo de la clase A. No obstante, el único Y150 (motivo II) está posicionado idealmente para actuar como un potencial donador de protones para el grupo nitrógeno betalactámico después de la acilación, y es generalmente aceptado que este residuo tiene un rol importante en la catálisis de las enzimas de clase C (Fenollar-Ferrer *et al.*, 2008).

Clase D SBLs (betalactamasas de serina)

Las enzimas de clase D tienen una secuencia truncada entre las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 5$, al igual que entre $\alpha 8$ y la hebra $\beta 7$, resultando en un sitio activo mucho más grande. Como para otras SBLs (betalactamasas de serina), las enzimas de clase D tienen cuatro sitios activos (I) S67XXK, (II) S115XXV, (III) el motivo K205-T/S-G, y (IV) el bucle Ω (Paetzel *et al.*, 2000). Comparado con la clase A de enzimas, el bucle Ω es más compacto y más lejano del núcleo del sitio activo, lo que resulta en una hendidura mucho más abierta para el sustrato. Además, el (motivo I) K70 está N-carboxilado en mayor o menor medida dependiendo la enzima OXA en cuestión (Majiduddin *et al.*, 2002). Al igual que en otras SBL (betalactamasas de serina), S67(motivo I) actúa como nucleófilo para atacar la amida betalactámica. Sin embargo, se cree que el papel de la carboxilación es aumentar la basicidad de K70 para que sirva como una base más potente para abstraer un protón directamente de S70 (Docquier *et al.*, 2009).

Además, se cree que la K70 carboxilada está posicionada de forma ideal para activar el agua desacilante durante la hidrólisis. El sitio activo de clase D tiene un carácter hidrofóbico significativo en proximidad a K70, un entorno que probablemente favorece la forma de base libre de la lisina, promoviendo su carboxilación en presencia de dióxido de carbono (Golemi *et al.*, 2001).

Las estructuras de los distintos grupos de beta-lactamasas se representan en la figura 5.

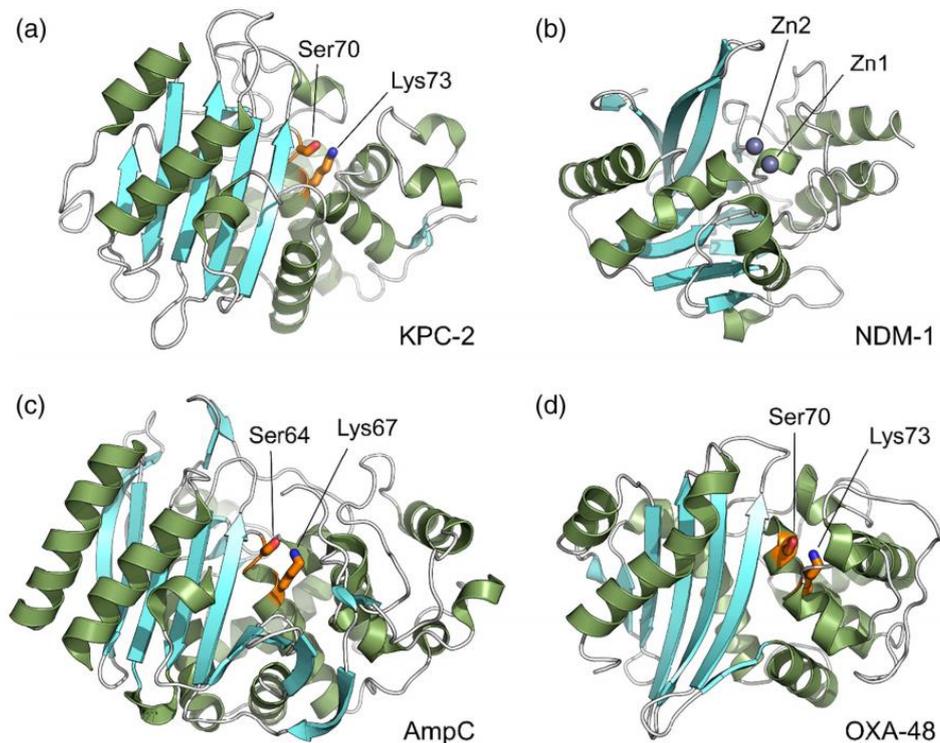


Figura 5. Estructura representativa de las beta-lactamasas de cada clase. Estructuras de cristal de las clases A, B, C y D. Los residuos catalíticos de importancia de serina beta-lactamasas (serina 64/70 y lisina 67/73, marcadas) están coloreadas de naranja, y los iones de las metalo beta-lactamasas se muestran en esferas grises. (a) Clase A KPC-2 (PDB 5ul8). (b) Clase B NDM-1 (PDB 5zgy). (c) Clase C AmpC (PDB 1ke4). (d) Clase D OXA-48 (PDB 3hbr). (Tomado de Tooke *et al.*, 2019).

β -lactamasas de *K. pneumoniae*

TEM (Temoneira enzyme) es el tipo de β -lactamasas que se encuentran en *K. pneumoniae*, estas enzimas son derivados de las enzimas TEM-1 y TEM-2. TEM-1 es la enzima con mayor importancia en las bacterias Gramnegativas. Ambas enzimas TEM-1 y TEM-2 son capaces de hidrolizar la penicilina y cefalosporinas de primera generación. La sustitución de aminoácidos está presente en muchos sitios de TEM-1. Estos reemplazos originan un cambio en el fenotipo de las betalactamasas de espectro extendido (BLES) y en su sitio activo que tiene acceso a las OXY MINO betalactamasas (Bonomo y Szabo., 2006; Pitout *et al.*, 2005).

β -lactamasa tipo SHV (clase A)

Este tipo de enzimas son derivados de SHV-1 (Sulfihídrido variable), y son las primeras enzimas encontradas en *K. Pneumoniae*, responsables de la resistencia a la ampicilina, existe una similitud estructural entre SHV-1 y TEM-1, y una semejanza de 68% de aminoácidos. Más de 50 variedades de SHV se han descubierto por el reemplazo de las combinaciones de aminoácidos. (Tzouvelekis *et al.*, 2000; Radice *et al.*, 2002).

β -lactamasas tipo CTX-M (clase A)

Las β -lactamasas tipo CTX tienen una alta capacidad de hidrólisis de la cefotaxima, más de 40 enzimas CTX-M son conocidas y se clasifican en cinco grupos.

1. Grupo CTX-M contiene 6 enzimas dependientes de plásmido
A-CTX-M1, CTX-M3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15 y, FEC-4.
2. Grupo CTX-M-2 que contiene 8 enzimas CTX-M dependientes de plásmido
CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 y Toto-1.
3. Grupo CTX-M-8 contiene un miembro dependiente de plásmido.
4. Grupo CTX-M-9 está conformado por 9 enzimas dependientes de plásmido
CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27 y Toho 2.
5. El grupo CTX-M-25 contiene a CTX-M-25 y CTX-M-26, CTX-M-2, CTX-M-3, y CTX-M-14 que tienen la mayor dispersión (3,32,52,53).

Estas enzimas hidrolizan más eficientemente a la cefalotina que a la penicilina, cefaloxina y ceftazidima. El tipo CTXM se encuentra en tres áreas geográficas; Sudamérica, lejano Oriente y Europa (Linscott *et al.*, 2005; Feizabadi *et al.*, 2010).

Carbapenémicos

Son antibióticos betalactámicos con un espectro mayor, actividad y resistencia a las betalactamasas. Tienen un amplio espectro de actividad y son muy efectivos contra bacterias Gramnegativas y Gram positivas.

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular y su eficacia se ve menguada por los distintos mecanismos de resistencia que posee la bacteria tales como enzimas que llevan a cabo la hidrólisis del antibiótico, expulsión del mismo mediante bombas de flujo, alteraciones en la permeabilidad y modificación del sitio blanco (Bennett *et al.*, 2009; Galdiero *et al.*, 2012; Jacoby *et al.*, 2004; Kitchel *et al.*, 2010; Leavitt *et al.*, 2009).

Carbapenemasas

Las betalactamasas capaces de hidrolizar carbapenemes están ordenadas de acuerdo a la clasificación molecular de Ambler; clase A (KPC), clase B (VIM, IMP, NDM) y la clase D (OXA-48), estas enzimas forman parte de la maquinaria molecular de *K. pneumoniae* (Nordmann *et al.*, 2011).

Mecanismo de las carbapenemasas

Mecanismo de hidrólisis por la clase A de β -lactamasas

En reacción con la β -lactamasa TEM (Temoneira), el carbapenem unido, inicialmente en el tautómero $\Delta 2$, podría desacilarse o alternativamente isomerizarse a la forma $\Delta 1$, más inerte, que se acumula como una especie estable unida a la enzima.

Trabajos anteriores (Zafaralla *et al.*, 1992). identificaron la protonación en C3 catalizada por el residuo Arg244 presente en TEM-1 y muchas otras enzimas de clase A, como elemento central de este proceso.

Las estructuras de cristal de los complejos de acilenzima generados por exposición de las enzimas de clase A a los carbapenems han descrito en su momento los modos de unión de los tautómeros $\Delta 2$ y $\Delta 1$, pero, de forma menos esperada, también revelaron una capacidad, en las enzimas TEM (Maveyraud *et al.*, 1998) y SHV (Nukaga *et al.*, 2008), del carbonilo de la acilenzima para migrar entre posiciones dentro y fuera del agujero de oxianiones formado por las amidas de la columna vertebral de los residuos 70 y 237.

La enzima KPC evade interacciones inhibitorias con los carbapenémicos. A medida que la información estructural de estas enzimas se ha hecho disponible (Swaren *et al.*, 1998; Sougakoff *et al.*, 2002; Ke *et al.*, 2007)., se reconoce que se distinguen de otras betalactamasas de clase A por la posesión de un puente disulfuro entre los residuos 69 y 238, y que sus sitios activos están hasta cierto punto ampliados a comparación de las enzimas inhibidas por los carbapenémicos, aunque no existan otras diferencias en el sitio activo (Ke *et al.*, 2007). Además, la importancia del disulfuro varía entre familias enzimáticas, se muestra esencial para la actividad de SME-1 contra cualquier substrato betalactámico (Majiduddin y Palzkill, 2003), y su inestabilidad por mutación daña severamente a las enzimas NMC-A y SFC-1, pero un mutante Cys69Gly de GES-5 está desestabilizado, pero catalíticamente competente (Smith *et al.*, 2016). Los autores concluyen que el disulfuro es importante a nivel estructural, pero no esencial para la actividad de la carbapenemasa.

Mientras que un complejo de acilenzima de carbapenem para KPC sigue siendo difícil de encontrar, la estructura de un complejo con el producto de hidrólisis del penem faropenem (Pemberton *et al.*, 2017) es coherente con muchos de estos hallazgos, implicando a residuos como Pro104, Thr237 y Val240 en la unión del sustrato en el contexto de un sitio activo sitio activo que es en general más hidrofóbico que el de enzimas como la CTX-M (Cefotaxima-M). No obstante, las aproximaciones computacionales de alto nivel, envuelven muchos microsegundos de simulaciones acumuladas, y que han sido aplicadas al estudio de la conformación y dinámica en KPC con el objetivo de establecer una base para la actividad de la carbapenemasa. Un hallazgo común es que el movimiento de Trp105, un residuo que se encuentra en un lado del sitio activo y que adopta múltiples conformaciones en las estructuras de cristal de la enzima sin ligando (Pemberton *et al.*, 2017). En estudios recientes que son simulaciones que se

caracterizan por acceder a escalas de tiempo no convencionales, muestran a la KPC no ligada que pasa por movimientos en las regiones del sitio activo, incluyendo Trp105 y el bucle Ω que contiene Glu166, están relacionados con las redes hidrofóbicas en los dominios α y α/β y sus interacciones directas con los substratos (Galdadas *et al.*,2018). Estudios experimentales de mutantes dirigidos al sitio apoyan estos descubrimientos al identificar a Trp105 como un determinante en la actividad de KPC (Papp-Wallace *et al.*, 2010).

Mecanismo de hidrólisis por la clase B de β -lactamasas

Recientemente, una combinación de UV-vis (utilizando ambas enzimas Zn (II) y sustituto Co (II)). NMR y espectroscopia de rayos X, junto con QM/MM y simulaciones MD, demostraron que las metalobetalactamasas de las tres clases utilizan un mecanismo común y ramificado de hidrólisis de carbapenémicos, con la posibilidad de protonar las especies aniónicas ya sea en la amida N (con la donación de protones del enlace metal-agua en la posición del puente) o en el C2 del solvente (Lisa *et al.*, 2017).

En un estudio de la enzima NDM-1 se observaron ambos tautómeros $\Delta 1$ y $\Delta 2$ del enlace-enzima del anillo abierto de imipenem y meropenem, es consistente con el mecanismo ramificado, pero se propone una reacción lineal donde la protonación ocurre exclusivamente por parte del solvente, esto se evidencia por los experimentos de NMR donde se identifica un solo diastereómero del producto de hidrólisis $\Delta 1$, y por la ausencia del enlace agua en la posición del puente de Zn, que en su lugar es ocupado por el nuevo carboxilato formado en C7 (Feng *et al.*,2017).

Por el contrario, los complejos carbapenémicos de VIM-1 (subclase B1) y SMB-1 (B3) solamente muestran el tautómero $\Delta 1$, pero también contienen una molécula de agua en la posición del puente interactuando con el grupo 6α -hidroxietil. Estas estructuras fueron obtenidas por una exposición prolongada al carbapenem más que las cortas sumergidas usadas en el estudio de NDM-1. Estos resultados sugieren que las especies formadas en la apertura del anillo betalactámico pueden caracterizar una denticidad Zn1 en coordinación por el producto carboxilado, pero una molécula de agua entrante a la posición del puente puede causar una reorganización en el complejo, posiblemente

involucrando una rotación alrededor del enlace C5-C6 del carbapenem (Salimraj *et al.*, 2018; Wachino *et al.*, 2016).

La existencia de los requerimientos secuencia/estructura para la rotación de los carbapenemes que son más rigurosos que aquellos de otros substratos, un estudio reciente y profundo de NDM-1 se identificó un número de posiciones en las cuáles la mutación afectó la hidrólisis del carbapenem mucho más severamente que en otros substratos (Sun *et al.*, 2018).

Mecanismo de hidrólisis por la clase C de β -lactamasas

Las betalactamasas de la clase C no son reconocidas por tener una actividad de carbapenemasas, la resistencia se obtiene por la habilidad de las cepas para reducir la permeabilidad de la pared celular, con la sobre expresión de las enzimas de la clase C para secuestrar los carbapenemes periplásmicos antes de que lleguen a su objetivo; las PBPs (Proteínas de unión a la penicilina) (Goessens *et al.*, 2013). De acuerdo a lo anterior las afinidades de la clase C de betalactamasas por los carbapenemes son generalmente altas (Mammeri *et al.*, 2010; Queenan *et al.*, 2010), y la estructura de cristal de la acilenzima formada por *E. coli* AmpC revela que el átomo de oxígeno del carbonilo presenta una rotación de 180° lejos del agujero oxianion, en un modo de enlace reminiscente como el observado en TEM-1 (Temoneira-1). Por lo tanto, aunque una molécula de agua se observa en la posición deacilante y esto no está involucrado en las interacciones con el grupo 6 α -hidroxietil del imipenem, la orientación de la acilenzima con el sitio activo es considerada desfavorable por su fácil deacilación. Esta estructura muestra el enlace de imipenem como la forma Δ pirrolina, con la implicación que la tautomerización de la acilenzima carbapenem puede ocurrir lentamente en la clase C de enzimas a comparación de otras betalactamasas.

Recientemente se han identificado enzimas de la clase C específicas capaces de hidrolizar carbapenemes, así como cefalosporinas de amplio espectro. Las estructuras de cristal están disponibles para dichas enzimas CMY-10 que tiene su origen en el plásmido en *Enterobacter aerogenes* (Kim *et al.*, 2006) y de la enzima cromosomal ADC-68 de *A. baumannii*. En ambos casos la rotación del carbapenémico se considera promovida por una delección de 3 aminoácidos en

el llamado bucle R2, ampliando el sitio activo puede mitigar posibles choques estéricos con las cadenas laterales C2 extendidas de muchos carbapenemes. La presencia en el ADC-68 de glicina, en lugar de la arginina más voluminosa que se encuentra en la enzima ADC-1 (que no hidroliza carbapenems), en un segundo bucle más corto (el bucle C) en la cara opuesta del sustrato puede ejercer un efecto similar (Jeon *et al.*, 2014).

Mecanismo de hidrólisis por la clase D de β -lactamasas

Dada la diversidad de la familia de enzimas OXA (Oxacilina), no es de sorprenderse que la variabilidad en las interacciones con los carbapenémicos sea evidente. La cristalización de OXA-24 fue la primera en estudiarse (Santillana *et al.*, 2007); esto ha revelado un espacio estrecho dentro del sitio activo, creado por la cercanía de Tyr112 y Met223 de lados opuestos a la hendidura de unión al sustrato, que se propone que orienta al carbapenémico para su hidrólisis con las interacciones del grupo 6α -hidroxietil. Los efectos de las mutaciones deletéreas en estas posiciones confirman la importancia de estos residuos para la rotación del carbapenémico. Sin embargo, una estructura del complejo acilenzima de OXA-24 sugiere que los residuos Tyr112 y Met223 sirven para restringir la orientación del C3 sustituto del enlace carbapenémico, favoreciendo así la retención de la configuración $\Delta 2$ para el anillo de pirridolina (Schneider *et al.*, 2011). El tautómero $\Delta 2$ también se observa en el complejo de OXA-51 y el doripenem (June *et al.*, 2016), aunque aquí la presencia de Trp en la posición 222, implica que perjudica el enlace con el carbapenémico (Smith *et al.*, 2015). Un puente hidrofóbico entre el equivalente de los residuos Phe110 y Met225 está presente en una estructura de OXA-58 enlazado con el análogo carbapenémico 6α -hidroximetil penicilina (Pratap *et al.*, 2015). Un estudio mutacional indicó que los efectos de las sustituciones en los residuos individuales del puente en la rotación del carbapenémico son dependientes del sustrato. Las estructuras de los complejos imipenem y meropenem de un doble mutante que carece del puente hidrofóbico, ambos revelaron el enlace de la pirrolina $\Delta 1$, pero en la forma R, en lugar de S, se concluye que la enzima de tipo salvaje los residuos del puente seleccionan el tautómero $\Delta 1$ -R pero no favorece a la forma $\Delta 2$ sobre la forma $\Delta 1$ -S (Stewart *et al.*, 2019).

La presencia de un puente hidrofóbico en el sitio activo representa una característica importante que contribuye a la actividad contra los carbapenémicos. OXA-48 (Oxacilina-48) está distantemente relacionada con las enzimas de *Acinetobacter*, está más relacionada con el grupo OXA-10 que no son consideradas carbapenemasas. De acuerdo a lo anterior, la estructura cristalina de OXA-48 (Docquier *et al.*, 2009) carece de un puente hidrofóbico en el sitio activo, esto puede explicar la retención de actividad contra otros sustratos como la oxacilina, que de hecho es un sustrato pobre para otras carbapenemasas tipo OXA (June *et al.*, 2014).

Sin embargo, simulaciones moleculares apoyan el rol para residuos equivalentes OXA-48 Thr213 y Arg214, al hacer interacción con el grupo sustituyente del carbapenémico 6 α -hidroxietil. Además, el intercambio de los residuos de 10 bucles que conectan a las láminas β 5 y β 6 en las carbapenemasas OXA (OXA-23, OXA-24 o OXA-48) en la cadena principal de la enzima OXA-10 (que no es considerada una carbapenemasa) resultó en la adquisición de actividad contra el imipenem (De Luca *et al.*, 2011). Este resultado sugiere que, a pesar de las diferencias en la secuencia y la naturaleza de las interacciones con el enlace carbapenémico, el bucle β 5– β 6 es un determinante en la actividad contra los carbapenémicos en la familia OXA (Oxacilina).

Todos estos estudios en conjunto, muestran características importantes para la hidrólisis de carbapenémicos por la familia de enzimas OXA. En primer lugar, las estructuras de los complejos carbapenémicos (Schneider *et al.*, 2011; June *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2013), indican que la estructura del sitio activo, en particular del puente hidrofóbico implica restricciones estéricas sobre la orientación y la forma tautomérica adecuada de la acilenzima carbapenémica. Segundo, la evidencia de complejos modelados (Docquier *et al.*, 2009) y estructuras experimentales (Pratap *et al.*, 2015) proponen que, para la clase A de carbapenemasas, las interacciones específicas que involucran al grupo sustituyente carbapenémico 6 α -hidroxietil puede ser importante en el posicionamiento y orientación de la molécula de agua deacilante. Finalmente, se ha propuesto (Smith *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2013) que los choques estéricos con el grupo carbapenémico 6 α -hidroxietil conlleva a una expulsión de agua del sitio activo en la acilación por carbapenémicos, reclutando una molécula de agua deacilante del solvente. Como resultado, la rotación del carbapenémico puede

ser dependiente del acceso de agua hacia el sitio activo, de tal manera que los cambios conformacionales en la acilenzima puedan ser necesarios para esto (Smith *et al.*, 2013). Observaciones recientes (Lohans *et al.*, 2018), demuestran que la disociación del carbapenémico por OXA-48 puede generar especies de lactona junto con los productos usuales de la hidrólisis. Esto sugiere que para algunos sustratos (1 β -metil) es posible la resolución de la acilenzima carbapenémico sin la necesidad de una molécula de agua deacilante.

Conclusiones

1. En este trabajo se estableció que *K.pneumoniae* puede ocasionar infecciones crónicas del hígado, infecciones asociadas a diálisis, a trasplantes de órganos, neumonía, meningitis, bacteremia, infecciones de heridas quirúrgicas y también infecciones crónicas de las vías urinarias adquiridas en la comunidad.
2. La patogenicidad de *K. pneumoniae* se debe a los diferentes genes de virulencia que posee, que incluyen adhesinas, protectinas o invasinas, sistemas de adquisición de hierro y toxinas.
3. Las cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes acarrean genes de resistencia a los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim, quinolonas, cloranfenicol, así como a los betalactámicos por la expresión de betalactamasas de espectro extendido (ESBLs) [*blaTEM* (contracción de Temoneira), *blaSHV* (sulfhídrido variable), *blaCTX-M* (cefotaxima) y *blaOXA* (oxacilina)].
4. Es importante que se establezcan programas de monitoreo en los hospitales que ayuden a reducir los riesgos de infecciones por *K. pneumoniae*, así como también mejorar las opciones de tratamiento contra este peligroso patógeno.

Bibliografía

1. Abreu O, Alpuche C, Arathoon E, Arbo A. Tratamiento de las enfermedades infecciosas. Quinta edición Washington, D.C: OPS, 2011.
2. Albesa I, Barberis LI, Pajaro MC, Farnochi MC, Eraso AJ. A thiol-activated haemolysin in Gram negative bacteria. *Can Microbiol* 1985; 31: 297-300.
3. Albesa I. (1989). *Klebsiella pneumoniae* haemolysin adsorption to red blood cells. *J App Bacteriol.* 67: 263-6.
4. Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lépine F, Dozois CM, & Weiser JN. (2011). *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infection and immunity.* 79(8), 3309-3316.
5. Bakhtiari R, Javadi A, Aminzadeh M, Molaei-Aghaee E, & Shaffaghat Z. (2021). Association between Presence of RmpA, MrkA and MrkD Genes and Antibiotic Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Iso-lates from Hospitals in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Public Health.* 50(5), 1009-1016.
6. Barberis LI, Eraso AJ, Pajaro MC, Albesa I. Molecular weight determination and partial characterization of *Klebsiella pneumoniae* haemolysin. *Can Microbiol.* 1986; 32: 884-8.
7. Bebrone C. (2007). Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* 74:1686–1701.
8. Bebrone C. (2009) The structure of the dizinc subclass B2 metallo-beta-lactamase CphA reveals that the second inhibitory zinc ion binds in the histidine site. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:4464–4471.
9. Bennett JW, Herrera ML, Lewis II, JS, Wickes BW, Jorgensen JH. (2009) KPC-2-Producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* Coinfection in a Liver Transplant Recipient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (1) 292-294.
10. Bentley R, Bennett JW. in *Advances in applied microbiology*, Vol. 52 (eds Laskin A. I., Bennett J. W. & Gadd G. M.) 303–331 (Academic Press, Cambridge, MA, USA, 2003).

11. Bonomo RA, Szabo D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 43(Supplement 2): S49–56.
12. Branger J, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, Florquin S, van der Poll T. (2004). Role of Toll-like receptor 4 in Gram-positive and Gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun.* 72:788 – 794.
13. Braun V, Focareta T. (1991). Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). *Crit Rev Microbiol* 18: 115-58.
14. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs (2017). *Medical Microbiology* 27th edition. McGraw Hill Professional; pp. 231–244.
15. Bush K (2012). Evolution of beta-lactamases: past, present, and future. In: Dougherty TJ and Pucci MJ (ed) *Antibiotic discovery and development*. Springer, New York, pp. 427–453
16. Bush K (2013). Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases. *Ann N Y Acad Sci.* 1277:84–90
17. Bustos YAC. Rubio VV & Navarro MMC. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 19(2):105-117.
18. Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica del Valle.* 38: 149-158.
19. Cai S, Batra S, Shen L, Wakamatsu N, Jeyaseelan S. (2009). Both TRIF and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary *Klebsiella* infection. *J Immunol.* 183:6629 –6638.
20. Chaves J. (2001). Caracterización molecular del gen de la β -lactamasa SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae*. (Tesis de doctorado, Universidad de Barcelona Facultad de Biología).
21. Chen N, Ou HY, van Aartsen JJ, Jiang X, Li M, Yang Z. (2010). The pheV Phenylalanine tRNA Gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates is an integration hotspot for possible niche-adaptation genomic islands. *Curr. Microbiol.* 60, 210–216. doi: 10.1007/s00284-009-9526-4.

22. Cortes G, Borrell N, de Astorza B, Gomez C, Sauleda J, Alberti S. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun.* 70:2583–2590.
23. Crosa JH, & Walsh CT. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews.* 66(2):223-249.
24. De Luca F, Benvenuti M, Carboni F, Pozzi C, Rossolini GM, Mangani S, & Docquier JD. (2011). Evolution to carbapenem-hydrolyzing activity in noncarbapenemase class D β -lactamase OXA-10 by rational protein design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18424-18429.
25. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, Spence S, Monaghan A, Kissenpfennig A, Ingram RJ, Bengoechea J, Gally DL, Fanning S, Elborn JS, Schneiders T. (2015). Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. *PLoS Pathog* 11:e1004627.
26. Delmas J (2010). Structural insights into substrate recognition and product expulsion in CTX-M enzymes. *J Mol Biol.* 400:108–120
27. Docquier JD, Calderone V, De Luca F, Benvenuti M, Giuliani F, Bellucci L & Mangani S. (2009). Crystal structure of the OXA-48 β -lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases. *Chemistry & biology.* 16(5), 540-547.
28. Egorov AM, Ulyashova MM & Rubtsova MY (2018). Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae.* 10(4):33-49.
29. El-Aouar Filho RA, Nicolas A, De Paula Castro TL, Deplanche M, De Carvalho Azevedo VA, Goossens PL, Taieb F, Lina G, Le Loir Y, Berkova N, (2017). Heterogeneous family of cyclomodulins: smart weapons that allow bacteria to hijack the eukaryotic cell cycle and promote infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:1–17.
30. Etebu E, & Arikekpar I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* 4:90-101.

31. Fang C-T, Chuang Y-P, Shun C-T, Chang S-C, Wang J-T. (2004). A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med.* 199:697– 705.
32. Feizabadi MM, Delfani S, Raji N, Majnooni A, Aligholi M, Shahcheraghi F. (2010). Distribution of bla TEM, bla SHV, bla CTX-M genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafnejad Hospital, Tehran, Iran. *Microb Drug Resist.* 16(1):49–53.
33. Feng H, Liu , Wang S, Fleming J, Wang DC & Liu W. (2017). The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis. *Nature communications.* 8(1): 1-11.
34. Fenollar-Ferrer C, Donoso J, Muñoz F, Frau J. (2008). Evolution of class C Î2 -lactamases: factors influencing their hydrolysis and recognition mechanisms. *Theor Chem Accounts.* 121:209–218
35. Frirdich E, Whitfield C. (2005). Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J Endotoxin Res.* 11:133–144.
36. Galdadas I, Lovera S, Perez-Hernandez G, Barnes DM, Jess H, Afsharikho H. (2018). Defining the architecture of KPC-2 carbapenemase: identifying allosteric networks to fight antibiotics resistance. *Sci Rep.* 8(1): 12916.
37. Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Della Pepa ME, D’Orlando V, Galdiero M. (2012). Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Curr. Prot Pept Sci.* 13: 843-854
38. Ghuysen JM. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins *Annual Rev Microbiol.* 45: 37–67
39. Goessens W H, van der Bij AK, van Boxtel R, Pitout JD, van Ulsen P, Melles DC & Tommassen J. (2013). Antibiotic trapping by plasmid-encoded CMY-2 ß-lactamase combined with reduced outer membrane permeability as a mechanism of carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 57(8): 3941-3949.

40. Golemi D, Maveyraud L, Vakulenko S, Samama JP, Mobashery S. (2001). Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D beta-lactamases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14280–14285
41. Hansen DS, Mestre F, Alberti S, Hernandez-Alles S, Alvarez D, Domenech-Sanchez A, Gil J, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ. (1999). *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J Clin Microbiol.* 37:56–62.
42. Harrison C.J & Bratcher D. (2008). Cephalosporins: a review. *Pediatrics in review.* 29(8):264.
43. Hermann JC, Hensen C, Ridder L, Mulholland AJ, Holtje HD. (2005). Mechanisms of antibiotic resistance: QM/MM modeling of the acylation reaction of a class A beta-lactamase with benzylpenicillin. *J Am Chem Soc.* 127:4454–4465
44. Hernandez Valladares M. (1997). Zn(II) dependence of the *Aeromonas hydrophila* AE036 metallo-beta-lactamase activity and stability. *Biochemistry.* 36:11534–11541.
45. Holden VI, & Bachman MA. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics.* 7(6):986-995.
46. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. (2004) Role of β -Lactamases and Porins in Resistance to Ertapenem and other β -Lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (8):3203-3206.
47. Jacoby GA. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 22:161–182,
48. Jeon JH, Hong MK, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM & Lee SH. (2014). Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* 70(11): 2924-2936.
49. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. (2012). Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci.* 1277:54–75.
50. June CM, Muckenthaler TJ, Schroder EC, Klamer ZL, Wawrzak Z, Powers R.A & Leonard DA. (2016). The structure of a doripenem-bound OXA-51

- class D β -lactamase variant with enhanced carbapenemase activity. *Protein Science*. 25(12):2152-2163.
51. June CM, Vallier BC, Bonomo RA, Leonard DA, & Powers RA. (2014). Structural origins of oxacillinase specificity in class D β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 58(1):333-341.
52. Ke W, Bethel CR, Thomson JM, Bonomo RA & van den Akker F. (2007). Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A β -lactamases. *Biochemistry*. 46(19):5732-5740.
53. Kelly JA, Moews PC, Knox J R, Frere J M, Ghuysen J M. (1982). Penicillin target enzyme and the antibiotic binding site *Science*. 218:479–481.
54. Kim JY, Jung HI, An YJ, Lee JH, Kim SJ, Jeong SH & Cha SS. (2006). Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C β -lactamase. *Molecular microbiology*. 60(4): 907-916.
55. King DT, Strynadka NC. (2012). Targeting metallo-beta-lactamase enzymes in antibiotic resistance. *Future Med Chem*. 5:1243–1263
56. Kitchel B, Rasheed K, Endimiani A, Hujer A, Anderson K, Bonomo R, Patel J. (2010). Genetic Factors Associated with Elevated Carbapenem Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 54 (10): 4201-4207.
57. Klemm P, Schembri MA. (2000). Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology*. 146 (Part 12): 3025–3032.
58. Konaklieva MI. (2014). Molecular targets of β -lactam-based antimicrobials: beyond the usual suspects. *Antibiotics* 3(2). 128-142.
59. Lawlor MS, Handley SA, Miller VL. 2006. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infect Immun*. 74:5402–5407.
60. Lawlor MS, O'connor C & Miller V.L. (2007). Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infection and immunity*. 75(3):1463-1472.
61. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. (2009). Ertapenem Resistance among Extended-Spectrum- β -

- LactamaseProducing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiol.* 47 (4): 969–974.
62. Li R, Oliver RA & Townsend CA. (2017). Identification and characterization of the sulfazecin monobactam biosynthetic gene cluster. *Cell chemical biology.* 24(1):24-34.
63. Lin YT, Jeng YY, Chen TL, Fung CP. (2010). Bacteremic community acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. *BMC Infect Dis.* 10:307.
64. Linscott AJ, Brown WJ. (2005). Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *J Clin Microbiol.*;43(3):1081–5.
65. Lisa MN, Palacios AR, Aitha M, González MM, Moreno DM, Crowder M. W & Vila AJ (2017). A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases. *Nature communications.* 8(1): 1-11.
66. Lohans CT, van Groesen E, Kumar K, Tooke CL, Spencer J, Paton RS & Schofield CJ. (2018). A New Mechanism for β -Lactamases: Class D Enzymes Degrade 1 β -Methyl Carbapenems through Lactone Formation. *Angewandte Chemie.* 130(5): 1296-1299.
67. Madigan MT & Martinko JM. (2006). *Brock biology of microorganisms.* 11th edition. Pearson Prentice Hall Inc.
68. Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill T (2002). Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbio* 292:127–137
69. Majiduddin FK, & Palzkill T. (2003). Amino acid sequence requirements at residues 69 and 238 for the SME-1 β -lactamase to confer resistance to β -lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 47(3): 1062-1067.
70. Mammeri H, Guillon H, Eb F & Nordmann P. (2010). Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 54(11):4556-4560.
71. Mandell G.L, Petri WA , Hardman J G, Limbird L E, Molinoff P B, Ruddon RW & Gilman AG. eds, McGraw Hill. (1996). *Antimicrobial agents:*

- Penicillins, Cephalosporins, and other β -lactam antibiotics The pharmacological basis of therapeutics. pp .1073–1101.
72. Maveyraud L, Mourey L, Kotra LP, Pedelacq JD, Guillet V, Mobashery S., & Samama JP. (1998). Structural basis for clinical longevity of carbapenem antibiotics in the face of challenge by the common class A β -lactamases from the antibiotic-resistant bacteria. *Journal of the American Chemical Society*. 120(38):9748-9752.
73. Ménétrey J, Gillet D, Ménez A,(2005). Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon* 45:129–137.
74. Merino S, Altarriba M, Izquierdo L, Nogueras MM, Regue M, Tomas JM. (2000). Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5 wb gene cluster and its role in pathogenesis. *Infect Immun*. 68:2435–2440.
75. Miller EL. (2002). The penicillins: a review and update. *Journal of midwifery & women's health*. 47(6):426-434.
76. Miranda-Navales, MG, Flores-Moreno K, López-Vidal Y, Rodríguez-Álvarez M, Solórzano-Santos F, Soto-Hernández JL & UNCAR Network. (2020). Antimicrobial resistance and antibiotic consumption in Mexican hospitals. *Salud Pública de México*. 62: 42-49.
77. Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, Kato N. (1983). Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun*. 40:56 –61.
78. Mohr KI. (2016). History of Antibiotics Research. How to Overcome the Antibiotic Crisis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 398:237–272.
79. Moreno C, González R, Beltrán C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista Otorrinolaringología Cirugía Cabeza y Cuello*. 69: 185-192.
80. Neilands JB. (1981). Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem*. 50: 715–731.
81. Neilands JB. (1981). Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr*. 1:27–46.
82. Nicolaou KC & Rigol S. (2017). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*. 71(2):153–184.

83. Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, & Oswald E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*, 313(5788), 848-851.
84. Nukaga M, Bethel CR, Thomson JM, Hujer AM, Distler A, Anderson VE & Bonomo RA (2008). Inhibition of class A β -lactamases by carbapenems: crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. *Journal of the American Chemical Society*. 130(38): 12656-12662.
85. Paczosa MK, & Meccas J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 80:629–661.
86. Paetzel M.(2000). Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol* 7:918–925.
87. Page MI, Badarau A (2008). The mechanisms of catalysis by metallo beta-lactamases. *Bioinorg Chem Appl*. 576297 10.1155/2008/576297.
88. Palzkill T. (2013). Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1277: 91.
89. Papp-Wallace KM, Taracila M, Wallace CJ, Hujer KM, Bethel CR, Hornick JM & Bonomo R. A. (2010). Elucidating the role of Trp105 in the KPC-2 β -lactamase. *Protein Science*. 19(9):1714-1727.
90. Peleg AY & Hooper DC. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine*. 362(19): 1804-1813.
91. Pemberton OA, Zhang X, & Chen Y. (2017). Molecular basis of substrate recognition and product release by the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2). *Journal of medicinal chemistry*. 60(8): 3525-3530.
92. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 46:1–11
93. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*. 56(1):52–9.
94. Podschun R, Ullmann U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 11:589 –603.
95. Poole K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 61(17):2200-2223.

96. Poole K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 61(17):2200-2223.
97. Pratap S, Katiki M, Gill P, Kumar P & Golemi-Kotra D. (2015). Active-site plasticity is essential to carbapenem hydrolysis by OXA-58 class D β -lactamase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 60(1): 75-86.
98. Queenan AM, Shang W, Flamm R & Bush K. (2010). Hydrolysis and inhibition profiles of β -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. Antimicrobial agents and chemotherapy. 54(1): 565-569.
99. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. (2002). Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob Agents Chemother. 46(2):602–4.
100. Raetz CR, Guan Z, Ingram BO, Six DA, Song F, Wang X, Zhao J. (2009). Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. J Lipid Res 50(Suppl):S103–S108.
101. Raymond, K., Dertz, E.M., (2004). Biochemical and physical properties of siderophores. In: Crosa, J.M., Mey, A.M., Pyne, S.M. (eds.), Iron Transport in Bacteria. ASM Press, Washington DC, pp. 1–16.
102. Ristuccia PA & Cunha BA. (1984). *Klebsiella*. Infection Control. 5(07): 343–347.
103. Salimraj R, Hinchliffe P, Kosmopoulou M, Tyrrell JM, Brem J, van Berkel SS & Spencer J. (2019). Crystal structures of VIM-1 complexes explain active site heterogeneity in VIM-class metallo- β -lactamases. The FEBS journal. 286(1): 169-183.
104. Samaha-Kfoury JN & Araj F. (2003). Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. Bmj. 327(7425): 1209-1213.
105. Santillana E, Beceiro A, Bou G & Romero A. (2007). Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 104(13): 5354-5359.
106. Schneider KD, Ortega CJ, Renck NA, Bonomo RA, Powers RA & Leonard DA. (2011). Structures of the class D carbapenemase OXA-24

- from *Acinetobacter baumannii* in complex with doripenem. *Journal of molecular biology*. 406(4): 583-594.
107. Shahid M, Sobia F, Singh A, Malik A, Khan HM, Jonas D & Hawkey PM. (2009). Beta-lactams and beta-lactamase-inhibitors in current-or potential-clinical practice: a comprehensive update. *Critical reviews in microbiology*. 35(2): 81-108.
 108. Siu LK, Fung CP, Chang FY, Lee N, Yeh KM, Koh TH. (2011). Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan. *J Clin Microbiol*. 49: 3761–3765.
 109. Skaar EP. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog*. 6:e1000949.
 110. Smith CA, Antunes NT, Stewart NK, Frase H, Toth M, Kantardjieff KA & Vakulenko S. (2015). Structural basis for enhancement of carbapenemase activity in the OXA-51 family of class D β -lactamases. *ACS chemical biology*. 10(8):1791-1796.
 111. Smith CA, Antunes NT, Stewart NK, Toth M, Kumarasiri M, Chang M & Vakulenko S.B. (2013). Structural basis for carbapenemase activity of the OXA-23 β -lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *Chemistry & biology*. 20(9): 1107-1115.
 112. Smith CA, Antunes NT, Toth M & Vakulenko SB. (2014). Crystal structure of carbapenemase OXA-58 from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 58(4): 2135-2143.
 113. Smith CA, Nossoni Z, Toth M, Stewart NK, Frase H, & Vakulenko SB. (2016). Role of the conserved disulfide bridge in class A carbapenemases. *Journal of Biological Chemistry*. 291(42): 22196-22206.
 114. Sougakoff W, L'Hermite G, Pernot L, Naas T, Guillet V, Nordmann P & Delettré J. (2002). Structure of the imipenem-hydrolyzing class A β -lactamase SME-1 from *Serratia marcescens*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 58(2): 267-274.

115. Sperandeo P, Dehò G & Polissi A. (2009). The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1791(7): 594-602.
116. Spratt BG. (1980). Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 289: 273–283
117. Stahlhut SG, Tchesnokova V, Struve C, Weissman SJ, Chattopadhyay S, Yakovenko O, Aprikian P, Sokurenko EV, Krogfelt KA. (2009). Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191: 6592–6601.
118. Standiford LR, Standiford TJ, Newstead MJ, Zeng X, Ballinger MN, Kovach MA, Reka AK, Bhan U. (2012). TLR4-dependent GM-CSF protects against lung injury in Gram-negative bacterial pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302: L447–L454.
119. Starost B. (2018). Resistencia a antibióticos beta-lactámicos en la actualidad. (Tesis de licenciatura, Universidad Complutense Madrid).
120. Stewart N.K, Smith CA, Antunes NT, Toth M & Vakulenko SB. (2019). Role of the hydrophobic bridge in the carbapenemase activity of class D β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 63(2): e02191-18.
121. Strynadka NC, Martin R, Jensen SE, Gold M, Jones JB. (1996) Structure-based design of a potent transition state analogue for TEM-1 beta-lactamase. *Nat Struct Biol*. 3:688–695.
122. Strynadka NC. (1992). Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature*. 359:700–705
123. Sun Z, Hu L, Sankaran B, Prasad BV & Palzkill T. (2018). Differential active site requirements for NDM-1 β -lactamase hydrolysis of carbapenem versus penicillin and cephalosporin antibiotics. *Nature communications*. 9(1): 1-14.
124. Swarén P, Maveyraud L, Raquet X, Cabantous S, Duez C, Pédelacq JD & Samama JP (1998). X-ray analysis of the NMC-A β -lactamase at 1.64-Å resolution, a class A carbapenemase with broad

- substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*. 273(41): 26714-26721.
125. Swaren P. (1995). Electrostatic analysis of TEM1 beta-lactamase: effect of substrate binding, steep potential gradients and consequences of site-directed mutations. *Structure* 3:603–613.
 126. Szarecka A, Lesnock KR, Ramirez-Mondragon CA, Nicholas HB Jr, Wymore T. (2011). The Class D beta-lactamase family: residues governing the maintenance and diversity of function. *Protein Eng Des Sel* 24:801–809.
 127. Tarkkanen AM, Westerlund-Wikstrom B, Erkkila L, Korhonen TK. 1998. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 66:2356 –2361.
 128. Turner PJ. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis* 41(Suppl 4): S273–S275.
 129. Tzouveleakis L, Tzelepi E, Tassios P, Legakis N. (2000). CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents*. 14(2):137–42.
 130. van Aartsen JJ, Stahlhut SG, Harrison EM, Crosatti MH, Ou Y, Krogfelt K. (2012). Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 12:59–59.
 131. Vercheval L. (2010). Three factors that modulate the activity of class D beta-lactamases and interfere with the post-translational carboxylation of Lys70. *Biochem J*. 432:495–504
 132. Vuillemin JP. 1890. Antibiose et symbiose. *Assoc. Franc. pour Avanc. Sci*. 2:525–543.
 133. Wachino JI, Yamaguchi Y, Mori S, Jin W, Kimura K, Kurosaki H & Arakawa Y. (2016). Structural insights into recognition of hydrolyzed carbapenems and inhibitors by subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 60(7): 4274-4282.
 134. Waksman SA. (1947.) What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia*. 39:565–569.
 135. Walsh TR. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 36 (Suppl 3): S8–S14.

136. Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. (1999). Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol.* 3:614–62.
137. Waxman, D J, Yocum, R R, & Strominger, J L (1980), Penicillins and cephalosporins are active site directed acylating agents: Evidence in support of the substrate analogue hypothesis *Philos Trans R– Soc Lond B Biol Sc.i* 289: 257–271.
138. Yeh K-M, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung C-P, Lin J-C, Chen T-L, Chang F-Y, Koh T-H. 2007. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *mpaA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol.* 45:466 – 471.
139. Yong D. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemothe.r* 53:5046–5054
140. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. (2008). Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 62:1–6.
141. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, Fung CP, Chuang YC. (2006). Association between *mpaA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 42:1351–1358.
142. Zafaralla G & Mobashery S. (1992). Facilitation of the DELTA. 2. fwdarw. DELTA. 1 pyrroline tautomerization of carbapenem antibiotics by the highly conserved arginine-244 of class A. beta-lactamases during the course of turnover. *Journal of the American Chemical Society.* 114(4): 1505-1506.
143. Zhang J, van Aartsen JJ, Jiang X, Shao Y, Tai C, He X. (2011). Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. *J. Microbiol. Methods.* 84: 283–289.