

Evaluación de la resistencia a los antibióticos en los fagoplásmidos de *Klebsiella pneumoniae* y su compuesto inhibidor

Ragıp Soner-Silme 

Center for Research and Practice in Biotechnology and Genetic Engineering, Istanbul University, Istanbul, Turquía

Resumen

Antecedentes: La resistencia a los antibióticos en *Klebsiella pneumoniae* representa un riesgo creciente para la salud humana en todo el mundo. **Objetivos:** Se utilizaron datos de secuencias completas del genoma para caracterizar los fagoplásmidos de *K. pneumoniae* aislados en diferentes países. **Métodos:** Se seleccionaron secuencias de 15 fagoplásmidos genéticamente similares mediante el análisis BlastN. Se analizaron los genes de resistencia a los antibióticos con las herramientas ResFinder, PhageAI, PlasmidFinder, PHASTEST y PhageGE. Posteriormente, se analizaron las secuencias de fagoplásmidos en busca de una región estable en el genoma mediante el análisis MAUVE, y la proteína de esta región estable y su molécula inhibidora candidata se analizaron mediante estudios de acoplamiento molecular. **Resultados:** Se detectaron varios genes de resistencia en 7 de los 15 fagoplásmidos analizados. Todos los plásmidos contenían el profago SSU5 de *Salmonella*. El análisis MAUVE indicó una región estable común que codifica la proteína de replicación A. Estudios de acoplamiento molecular demostraron que existe una interacción entre la proteína de replicación A y un derivado de la Fabimicina. **Conclusiones:** La Fabimicina podría utilizarse para controlar tanto los plásmidos fágicos como a su huésped, lo que podría afectar la gravedad e incidencia de las infecciones por *K. pneumoniae*.

PALABRAS CLAVE: Resistencia a antibióticos. BLASTN. Fabimicina. Plásmidos fágicos. Proteína de replicación A.

Assessing of antibiotic resistance in the phage-plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and its inhibitory compound

Abstract

Background: Antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* poses an increasing risk to human health worldwide. **Objectives:** Whole-genome sequence data were used to characterize *K. pneumoniae* phage-plasmids isolated in different countries. **Methods:** Sequences of 15 genetically similar phage-plasmids were selected based on BlastN analysis. Antibiotic resistance genes were screened using ResFinder, PhageAI, PlasmidFinder, PHASTEST, and PhageGE tools. Phage-plasmid sequences were then analyzed for a stable region in the genome using MAUVE analysis, and the protein of this stable region and its candidate inhibitor molecule were analyzed through molecular docking studies. **Results:** Several resistance genes were detected in 7 of the 15 phage-plasmids screened. All plasmids had the *Salmonella* SSU5 prophage. MAUVE analysis indicated a common stable region encoding replication protein A. Molecular docking studies demonstrated that an interaction occurs between replication protein A and a fabimycin derivative. **Conclusion:** Fabimycin could be used to control both phage plasmids and their host, which could affect the severity and incidence of *K. pneumoniae* infections.

KEYWORDS: Antibiotic resistance. BLASTN. Fabimycin. Phage-plasmids. Replication protein A.

Correspondencia:

Ragıp Soner-Silme
E-mail: rsoner@istanbul.edu.tr

Fecha de recepción: 12-05-2025

Fecha de aceptación: 02-06-2025

DOI: 10.24875/GMM.M25001011

Gac Med Mex. 2025;161:370-381

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2025 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram-negativo comensal, caracterizado por su naturaleza entérica encapsulada y no móvil. *K. pneumoniae* puede causar una amplia gama de infecciones asociadas a la atención médica, incluidas neumonías, bacteriemias, meningitis, heridas o infecciones asociadas al sitio quirúrgico¹. El punto más importante en el ciclo de vida de *K. pneumoniae* es su acceso al cuerpo, ya que esto influye en si su comportamiento será comensal o patógeno. *K. pneumoniae* representa el 8% de todas las infecciones nosocomiales, siendo la neumonía la principal causa de casos. La infección por *K. pneumoniae* solo sobreviene cuando la bacteria es capaz de evadir y superar las respuestas inmunes primarias y secundarias del huésped, un escenario altamente probable en entornos hospitalarios. La propagación de la infección por *K. pneumoniae* ocurre principalmente a través del contacto persona a persona. Aunque menos común, la transmisión también puede ocurrir a través de heridas abiertas, cortes desatendidos, contusiones o contaminación ambiental.

Se han documentado varios brotes de infecciones por *K. pneumoniae* a nivel mundial. Se estima que casi el 12% de todos los casos de neumonía adquirida en el hospital a nivel mundial son causados por este patógeno². Según lo informado por los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), aproximadamente el 80% de las infecciones por Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos se deben a *K. pneumoniae*².

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado a este patógeno bacteriano como una amenaza crítica debido a su resistencia adquirida a fármacos actuales como meticilina, penicilina, oxacilina, cefoxitina y carbapenémicos³. La presencia de enzimas β -lactamasa, combinada con alteraciones en las bombas de eflujo, ha facilitado la diversificación clonal de cepas resistentes a antibióticos en esta bacteria^{1,4}. Por lo tanto, la situación actual subraya la necesidad urgente de desarrollar compuestos terapéuticos potentes y novedosos para combatir tales infecciones patógenas.

Obtener información genética completa de organismos vivos resulta esencial para lograr una comprensión integral de los mismos como sistemas biológicos. Varias bases de datos y herramientas bioinformáticas están disponibles para la anotación funcional y estructural de proteínas hipotéticas. Se emplearon

extensamente enfoques computacionales para el seguimiento de la resistencia a antibióticos⁵. Los avances recientes en ciencias médicas y farmacéuticas han utilizado de manera prominente datos derivados de secuencias completas del genoma^{6,7}. Dentro de este conjunto de datos, el análisis de fagos, plásmidos y resistomas de antibióticos tiene una promesa considerable para las ciencias de la vida, posibilitando un conocimiento más profundo de los mecanismos de defensa empleados por los patógenos. Los profagos se consideran factores fundamentales que contribuyen a la virulencia bacteriana, la diversificación genómica y la aptitud y son prevalentes en todos los genomas bacterianos⁸. Además, la resistencia a los antibióticos sigue siendo una preocupación significativa⁹. La identificación y clasificación de los genes responsables de la resistencia a los antibióticos puede facilitar el desarrollo de nuevos compuestos antibióticos.

En este estudio, se investigaron las secuencias genómicas completas de 15 plásmidos fágicos seleccionados de cepas de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* por sus perfiles de resistencia a antibióticos y se buscaron regiones estables que pudieran ser objetivo de un compuesto inhibidor.

Materiales y métodos

Análisis BLAST y selección de secuencias

La secuencia del plásmido pKPHS1 de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286 (*National Center for Biotechnology Information* [NCBI] Acc. No: CP003223.1), que pertenece al fago *Salmonella* SSU5, fue sometida a una búsqueda BLASTN en el NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, consultado el 28 de diciembre de 2024). A partir de los resultados de BLAST, se seleccionaron las secuencias genómicas completas de 15 plásmidos fágicos por su posición en el árbol filogenético, y las secuencias se descargaron de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabla 1). Las secuencias se proporcionan en el material adicional S1.

Análisis del resistoma de antibióticos

Las regiones de resistencia a antibióticos de los plásmidos se determinaron mediante el método bioinformático de Zankari et al.¹⁰. Los genes de resistencia a antimicrobianos (RAM) se identificaron utilizando la

Tabla 1. Las 15 secuencias genómicas completas seleccionadas de fagoplásmidos de *Klebsiella pneumoniae* utilizadas para los análisis. El símbolo "-" representa "desconocido". Las secuencias se listan según su posición en el árbol filogenético del análisis BLAST en la figura 1.

N.º	Número de acceso NCBI	País de origen	Fuente de aislamiento	Longitud (bp)	Fecha de recolección/envío
1	CP129187.1	China: Jiangsu	-	135702	Noviembre-2022/28 junio 2023
2	CP152770.1	Noruega	Sangre: Homo sapiens	110383	2017/22 marzo 2024
3	CP166442.1	EE.UU.	Hisopado rectal: Homo sapiens	106731	21 abril 2024/15 mayo 2024
4	CP133013.1	India: Bangalore	Orina: Homo sapiens	122792	17 marzo 2023/11 agosto 2023
5	CP146193.1	China: Kunming	Homo sapiens	112792	11 enero 2020/08 febrero 2024
6	CP138518.1	China: Wuhan	Orina: Homo sapiens	111727	26 septiembre 2020/22 septiembre 2023
7	CP107386.1	China: Wuhan	Espujo: Homo sapiens	111727	04 diciembre 2018/07 octubre 2022
8	CP133391.1	India: Bangalore	Orina: Homo sapiens	122824	24 febrero 2023/24 agosto 2023
9	CP166074.1	Indonesia: Mataram	Cepa de laboratorio	122802	11 julio 2024/05 agosto 2024
10	MZ475705.1	China	Transconjugante	246861	15 diciembre 2020/10 junio 2021
11	CP107348.1	China: Wuhan	Espujo: Homo sapiens	111727	04 diciembre 2018/07 octubre 2022
12	CP102393.1	China: Beijing	Sangre	113637	19 diciembre 2021/04 agosto 2022
13	OU877720.1	España	-	118859	19 octubre 2021
14	CP021962.1	EE.UU.	-	132217	13 junio 2017
15	CP003223.1	China: Shanghái	-	122799	22 diciembre 2011

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

herramienta ResFinder 4.6.0 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) con un umbral de identidad del 90%. Además, el tipo de fago y el contenido de GC se determinaron mediante PhageAI (<https://app.phage.ai/phages>) y los replicones de plásmidos se determinaron con PlasmidFinder 2.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>, consultado el 29 de diciembre de 2024)¹¹.

Las secuencias se analizaron por números de acceso, utilizando el servidor web PHASTEST¹². Los resultados de PHASTEST clasificaron los genomas de fagos como intactos, cuestionables o incompletos en base al recuento de secuencias codificantes de ADN vinculadas a profagos y la detección de genes asociados a fagos. El árbol filogenético de los plásmidos-fagos se construyó mediante PhageGE (https://jason-zhao.shinyapps.io/PhageGE_Update)¹³.

Alineamiento de secuencias, modelado por homología, predicción de proteínas y análisis de acoplamiento

Se utilizó Progressive-MAUVE del software Geneious (Geneious Prime® 2025.0.3) para determinar las

regiones comunes entre todos los genomas¹⁴⁻¹⁶. La región genómica invariante se eliminó y la secuencia se transformó en una secuencia de proteínas utilizando el servidor de proteómica ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>)¹⁷ y luego se cargó en el servidor I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement) de la Universidad de Michigan, EE.UU. (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) para la predicción de proteínas^{15,18}. Los modelos de homología para la proteína objetivo, predichos por el sistema de servidor I-TASSER, se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org) (Tabla 2). Las secuencias de proteínas se alinearon y el modelado por homología se realizó utilizando el servidor de proteómica ExPASy para obtener más información estructural¹⁹.

Tanto el modelado por homología como el análisis de predicción de proteínas se han utilizado para probar el gen responsable de la proteína de replicación A, con un derivado de fabimicina como ligando. La estructura del derivado de fabimicina se recuperó de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esta estructura se utilizó para los cálculos de acoplamiento. La estructura 3D seleccionada del

Tabla 2. Lista de genes de resistencia antibiótica en los fagoplásmidos seleccionados. Como se muestra, los fagoplásmidos albergan un amplio espectro de genes de resistencia.

Propiedades del fago				Resistencia a genes				
ID del plásmido	Contenido GC (%)	Tipos de fago	Replicones de plásmido	Resistencia a Aminoglucósidos	Beta-lactámicos	Sulfonamidas	Amfenicol	Fosfomicina
1	50.41	Templado	IncFIB	aac (3)-IV, aadA1, aph (4)-Ia, aadA1	-	sul3	cmlA1	-
2	49.09	Templado	IncFIB	-	-	-	-	-
3	49.19	Virulento	IncFIB	-	-	-	-	-
4	49.45	Templado	IncFIB	-	blaCTX-M-15	-	-	-
5	48.98	Virulento	IncFIB	-	-	-	-	-
6	48.95	Virulento	IncFIB	-	-	-	-	-
7	48.95	Virulento	IncFIB	-	-	-	-	-
8	49.44	Templado	IncFIB	-	blaCTX-M-193	-	-	-
9	49.47	Templado	IncFIB	-	blaCTX-M-14	-	-	-
10	47.42	Templado	IncFIB	aac (6')-Ib3, aadA1, aph (3')-XV	blaCTX-M-3, blaVIM-1, blaTEM-1B	-	catB2	fosA3
11	48.95	Virulento	IncFIB	-	-	-	-	-
12	49.11	Virulento	IncFIB	-	-	-	-	-
13	49.30	Templado	IncFIB	-	-	-	-	-
14	49.12	Templado	IncFIB	aph (3')-VI	blaNDM-1	-	-	-
15	49.46	Templado	IncFIB	-	blaCTX-M-14	-	-	-

ligando se recuperó de la base de datos de compuestos PubChem en formato de archivo de datos de estructura, seguida de la conversión a formato mmol2. El acoplamiento ciego guiado por detección de cavidades se realizó principalmente para analizar la interacción entre la proteína de replicación A y el derivado de fabimicina (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/>)²⁰. Los resultados del acoplamiento se visualizaron con UCSF Chimera (ver. 1.18) y Biovia discovery studio visualizer (ver. 24.1.0.23298)^{21,22}. Posteriormente, se realizó un acoplamiento específico de acuerdo con los resultados y coordenadas del acoplamiento ciego previo. Los parámetros del ligando se analizaron utilizando el servidor en línea PRODRG (<http://prodr2.dyn dns.org/cgi-bin/prodr2.cgi>)²³. Se aplicó el principio de complementariedad de forma con una desviación cuadrática media de las raíces de agrupación de 4.0 para los cálculos de acoplamiento. El estudio de acoplamiento flexible se realizó utilizando AutoDock v 4.0²⁴. El análisis de interacción de los complejos proteína-ligando

y sus posiciones de aminoácidos con distancias de enlace se calcularon y visualizaron utilizando el software PyMol (Ver. 3.1)²⁵. Los resultados de la simulación de acoplamiento molecular también se confirmaron mediante el servidor de acoplamiento de proteínas SWISS-DOCK (<http://www.swissdock.ch/docking>) dentro de las interacciones entre receptores de proteínas y ligandos²⁶. Posteriormente, se utilizó pymol para obtener información sobre todas sus preferencias de unión dentro del sitio activo de estos receptores²⁵.

Resultados

Análisis BLAST

El análisis BLAST mostró que muchas cepas de *K. pneumoniae* tienen las secuencias del fago *Salmonella* SSU5 como profago integrado cromosómicamente o fagoplásmido. Se seleccionaron 15

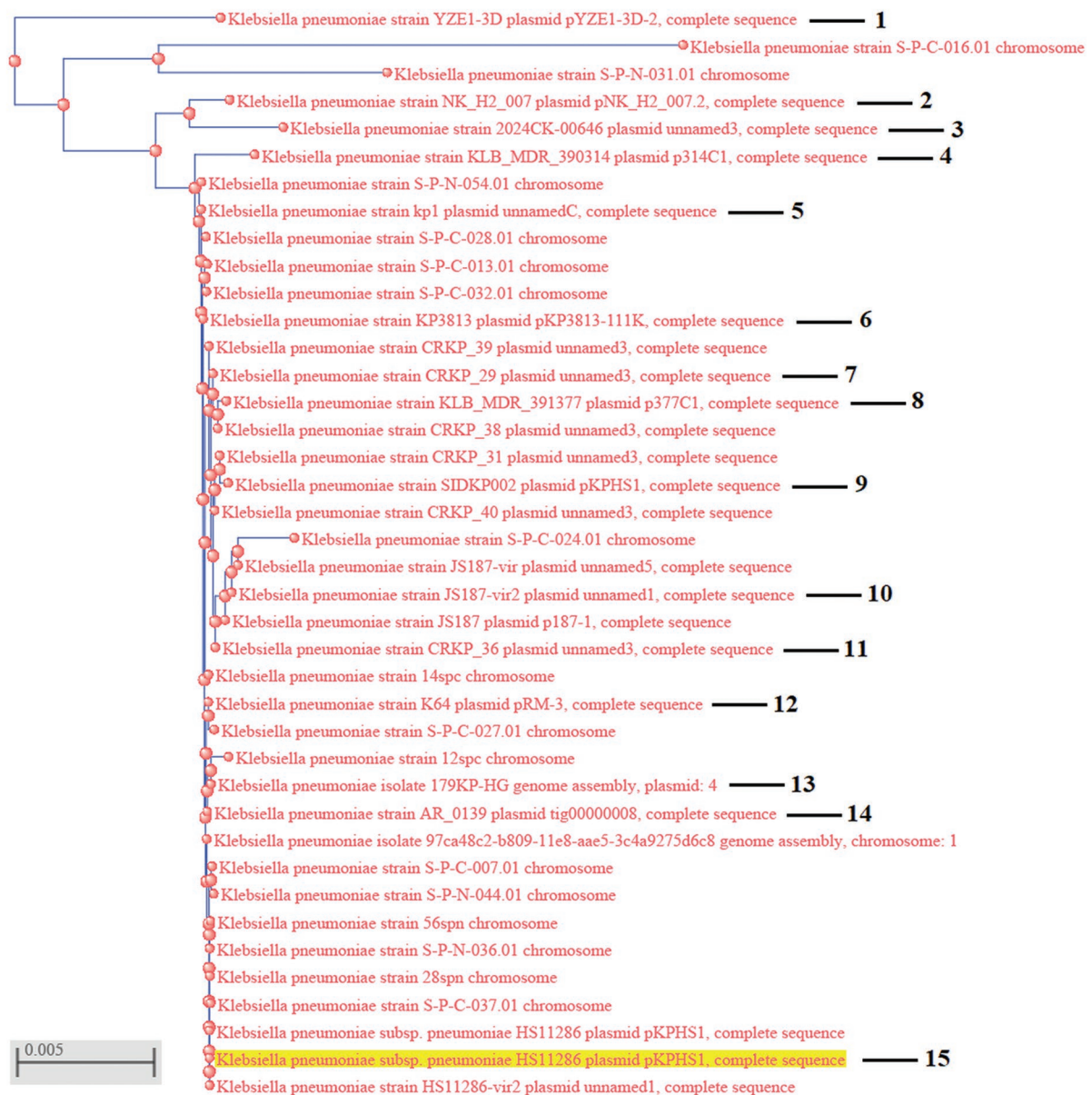


Figura 1. Análisis BLAST de la secuencia del plásmido pKPHS1. Se numeran los fagoplásmidos seleccionados utilizados en análisis posteriores.

fagoplásmidos según sus posiciones en el árbol filogenético del análisis BLAST (Fig. 1).

Análisis del resistoma de antibióticos y alineación de secuencias

Se hallaron varios genes de resistencia a antibióticos en 7 de los 15 plásmidos seleccionados (Tabla 2). Los resultados fenotípicos predichos indican resistencia a aminoglucósidos desconocidos, gentamicina, tobramicina, higromicina, estreptomina, espectinomina, amikacina, amoxicilina, amoxicilina + ácido

clavulánico, ampicilina, ampicilina + ácido clavulánico, cefepima, cefixima, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, piperacilina, ertapenem, imipenem, meropenem, piperacilina + tazobactam, aztreonam, temocilina, ticarcilina, ceftazidima + avibactam, ceftriaxona, cefalotina, sulfametoxazol y fosfomicina-cloranfenicol (Tabla 2). Se halló que el 10º fagoplásmido de origen chino era el que presentaba la mayor cantidad de regiones de resistencia a antibióticos, y un mayor número de nucleótidos que los demás. También fue descrito como “transconjugante” en el sistema NCBI (Tablas 1 y 2).

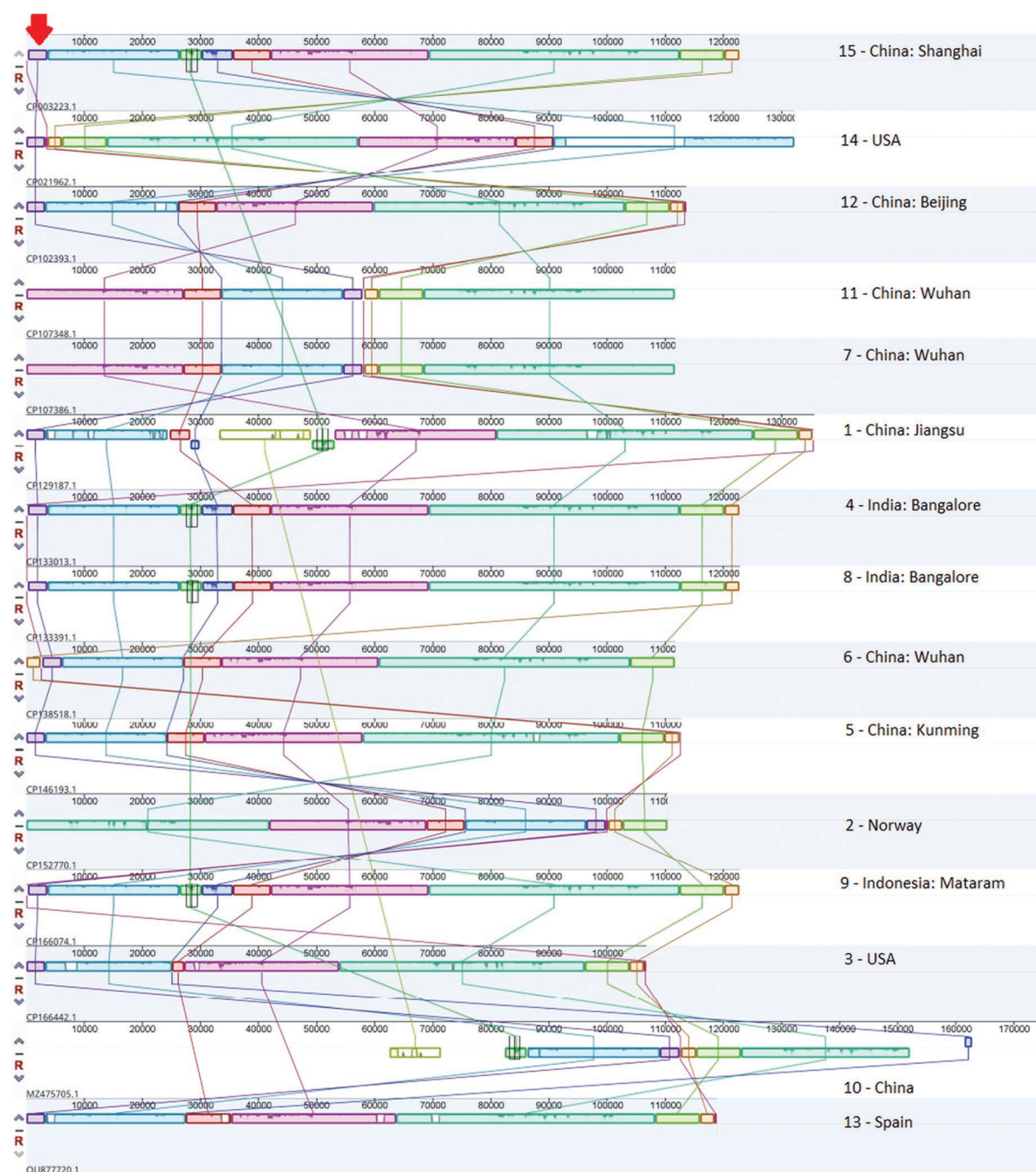


Figura 2. Resultados del análisis Progressive MAUVE de fagoplásmidos. La región de la izquierda (púrpura), marcada con una flecha roja, y con una longitud de 0-300 bp, se muestra genéticamente estable entre todas las secuencias.

Se debe mencionar que el análisis de Phage AI clasificó 6 de los fagoplásmidos como virulentos y el resto como templados (Tabla 2). Esta propiedad podría afectar la gravedad de la infección por neumonía en los pacientes. Todos los replicones de plásmidos pertenecen al grupo IncFIB (Tabla 2), lo cual confirma estudios previos que indicaron que las β -lactamasas de espectro extendido suelen estar asociadas con plásmidos tipo

IncF^{27,28}. Se debe mencionar que los plásmidos IncF utilizan sistemas de muerte post-segregacional y adición para asegurar su propagación y mantenimiento entre poblaciones bacterianas de alto riesgo²⁹.

El análisis de Mauve reveló una comparativa genómica entre 15 fagoplásmidos diferentes, destacando la presencia de regiones comunes en el genoma (Fig. 2). La salida del análisis de comparativa

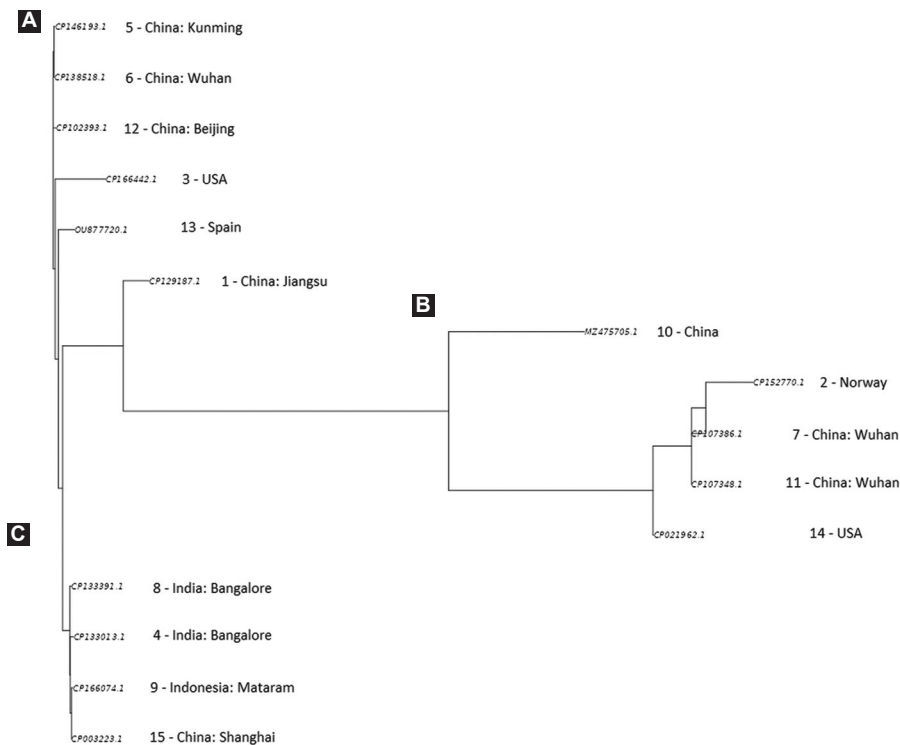


Figura 3. El árbol filogenético de los 15 fagoplásmidos seleccionados muestra 3 ramas principales: A, B, C. El árbol filogenético indica que la raíz ancestral es India o China.

genómica mostró variación y similitud basadas en los orígenes de los subtipos (Fig. 2). Se observaron patrones de agrupamiento similares entre las mismas regiones geográficas. Los subtipos con el mismo origen se agruparon dentro del mismo sub-clúster, como las secuencias 11 y 7 de China, Wuhan; 4 y 8 de India, Bangalore y 6 y 5 de Wuhan y Kunming en China. Estos hallazgos indican que los plásmidos, especialmente de China e India, muestran una diversidad genética similar, ya que geográficamente son vecinos. Además, el árbol filogenético construido por PhageGE confirmó la presencia de 3 grupos principales (A, B, C) en la figura 3, validando, más si cabe, los resultados de Mauve. Los datos filogenéticos recientes indican que el inicio del proceso de evolución de los fagoplásmidos es China o India, lo cual deberían confirmar nuevos estudios.

El árbol filogenético se corresponde con el mapa de Mauve y proporciona información sobre la propagación de los fagoplásmidos en los países. China o India fue el punto de origen y se extendió a otros países desde estos orígenes. Se puede predecir que el aumento del transporte y el comercio, especialmente entre países cercanos y lejanos, es resultado

de esta diseminación. Aunque no se puede afirmar nada de las 15 secuencias limitadas que no representan el perfil de patógenos de los países, la posibilidad de una epidemia es un hecho bien conocido, y en este sentido, la distribución de fagoplásmidos en otros países debería examinarse con estudios más amplios. Se sabe que estos fagoplásmidos afectan la infección bacteriana y la resistencia a los antibióticos. En este sentido, también debe investigarse si el fago derivado de *Salmonella* alojado por *K. pneumoniae* podría aumentar la incidencia del desarrollo de la enfermedad.

La distribución genética circular del fagoplásmido 1 (China: Jiangsu) según los resultados de PHASTEST se muestra en la figura 4. Las distribuciones genéticas de todos los fagoplásmidos se ofrecen en el material adicional S2. La tabla 3 muestra que 15 plásmidos contenían el fago *Salmonella* SSU5 (NCBI Acc. No: NC_018843) y 14 de ellos, fago intacto. Las longitudes de las regiones y los contenidos de GC fueron distintos en todos los fagos. Un estudio reciente ha demostrado que se predijo que un plásmido en la cepa *K. pneumoniae* Kp1604 era un fago *Salmonella* SSU5 intacto y que el fago podría contribuir a la defensa del

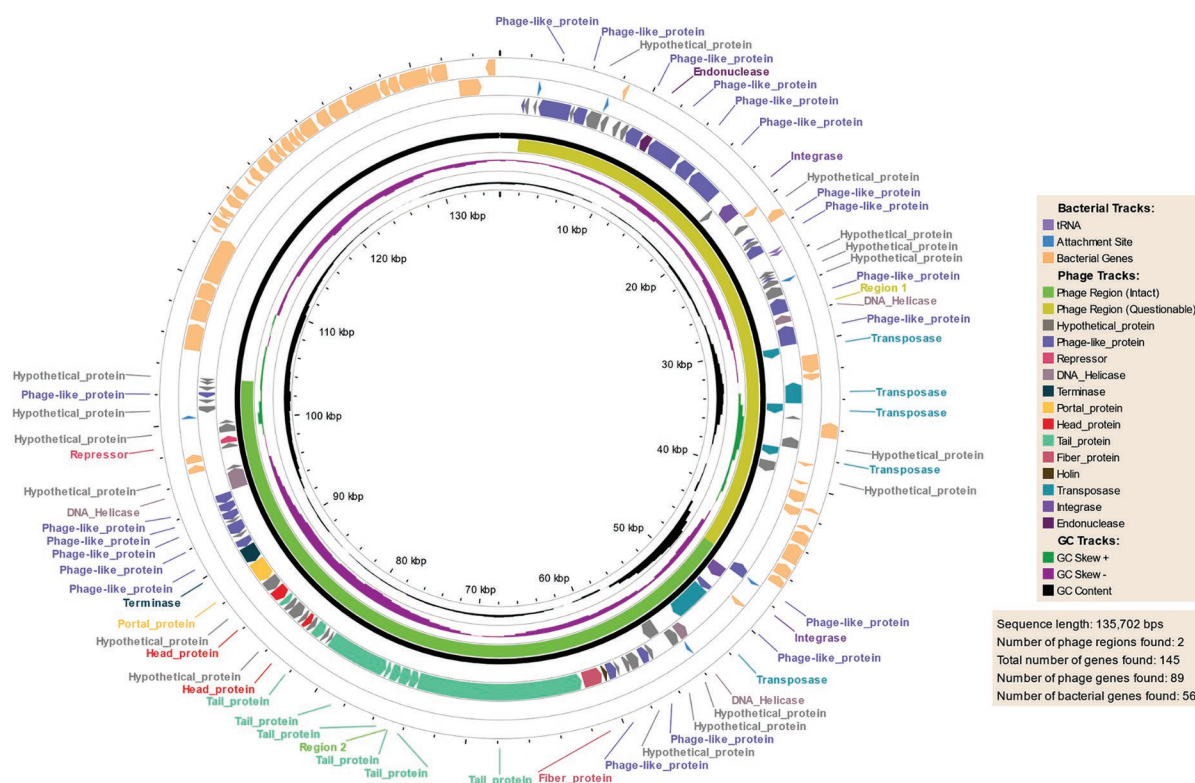


Figura 4. Ejemplo de plásmido 1 (China: Jiangsu) para mostrar la distribución genómica circular de los genes.

MLSAVNDMLSAVRYMLPTVLCMLSAVIDVCCQRLEPKGIHMSTKNKKESEIKEIPEDNEI
LEEDALNLYTGDLVPNSNNTVQPIALMRLGLFVPTLKGTKNSSRNKSNMIDASRELVQLE
VARSEGYSNIKITGPRLDMDHDFKTWVGVRSLAEYGEPTGRVELSITKFAKFCGYPSQ
IRKTLRDRI.TNSL.IK

Figura 5. Los resultados de la secuencia enviada se transformaron en una secuencia de aminoácidos a través del servidor de proteómica ExPASy (<https://web.expasy.org/translate>) para facilitar el análisis estructural utilizando el servidor I-TASSER.

huésped contra los elementos de ADN transportados³⁰. Estudios adicionales sobre este mecanismo podrían ayudarnos a comprender cómo proporciona fenotipos adaptativos al huésped durante la infección.

Alineamiento de secuencias, modelado por homología, predicción de proteínas y análisis de acoplamiento

En el análisis de Mauve se observó que la región inicial de 0-320 bp era la región invariante (Figs. 2 y 5). El análisis de Swiss dock de esta región nos mostró que se trata de la proteína de replicación A (gen: A0A0H3GVC2_KLEPH, organismo: *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* (cepa HS11286; <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A0H3GVC2/entry>). Esta proteína

puede utilizarse como sitio diana para el desarrollo de moléculas antifagoplásmido. Aunque los resultados de I-TASSER predijeron los mayores aciertos de PDB y se enumeraron en la tabla 4, las proteínas predichas fueron en su mayoría varias proteínas de iniciación de replicación bacteriana. Las simulaciones de acoplamiento se realizaron considerando los resultados de Swiss dock (Material adicional S3).

El análisis I-TASSER de esta región revela que el ligando es un fármaco nucleósido (ácido) llamado (2E)-3-[(7S)-7-amino-8-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-3-il]-N-metil-N-[(3-metil-1-benzofuran-2-il)metil]prop-2-enamida³¹ es un derivado de la fabimicina (Material adicional S3). Se ha encontrado una patente sobre este fármaco nucleósido (ácido) y también un ensayo clínico relacionado^{32,33}. El análisis de acoplamiento ciego de la proteína de

Tabla 3. Lista de propiedades de fagos según los resultados de PHASTEST. Los datos indican que los fagoplásmidos varían en muchas propiedades genómicas (por ejemplo, longitud de la región, cantidad de proteínas, contenido de GC) y se distribuyen en diferentes regiones del genoma del plásmido.

ID del Plásmido	Región	Longitud de la región (Kb)	Complejidad	Nº Total de Proteínas	Posición de la Región	Fago más común	Contenido GC (%)
1	1	52.3	Cuestionable	43	1550-53924	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	52.26
	2	56.3	Intacto	56	46860-103245	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	51.31
2	1	92.3	Intacto	90	17908-110253	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.21
3	1	77.2	Intacto	78	1550-78766	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.32
4	1	64.1	Intacto	70	26523-90658	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	50.31
5	1	89.3	Intacto	80	1550-90868	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	48.85
6	1	92.6	Intacto	83	1-92641	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	48.75
7	1	80.4	Intacto	77	1-80454	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.20
	2	20.9	Cuestionable	32	90403-111370	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.76
8	1	64.1	Intacto	70	26524-90687	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	50.31
9	1	64.1	Intacto	68	26524-90665	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	50.37
10	1	51.1	Incompleto	50	89918-141106	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.42
	2	39.5	Cuestionable	33	141031-180549	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.43
11	1	80.4	Intacto	77	1-80454	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.20
	2	20.9	Cuestionable	32	90403-111370	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.76
12	1	90.1	Intacto	82	1550-91713	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.01
13	1	29.7	Incompleto	28	1-29774	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.22
	2	59	Intacto	66	27379-86402	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	50.00
14	1	63.6	Intacto	63	35850-99511	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.07
15	1	25.9	Incompleto	27	72-26052	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	49.10
	2	64.1	Intacto	74	26524-90662	PHAGE_Salmon_SSU5_NC_018843	

Tabla 4. Modelado por homología de las proteínas usando I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) y considerando la secuencia específica

Rango	PDB Hit	Identidad 1	Identidad 2	Cobertura	Norm. Z-score
1*	2NRA	0.07	0.22	0.90	1.69
2	6H24	0.08	0.17	0.26	1.19
3	5UBFA	0.19	0.15	0.44	1.08
4	2NRA	0.06	0.22	0.35	1.06
5	6H24	0.12	0.17	0.35	1.08
6	2Z9O	0.14	0.19	0.43	1.06
7	2Z9O	0.17	0.19	0.74	1.08
8	5UBF	0.21	0.18	0.43	1.03
9	6KLCA	0.21	0.17	0.85	0.60
10	7TB0A	0.12	0.16	0.85	0.68

*El PDB hit más alto fue 2NRA. PDB: banco de datos de proteínas.

replicación A con el derivado de fabimicina mostró una interacción entre ellos (Material adicional S4). Interacción que se confirmó con AutoDock (Fig. 6) siendo la energía de unión, $-7,82$ kcal/J (Material adicional S3).

Discusión

La distribución de los fagoplásmidos en este estudio muestra que existe una resistencia particular a los antibióticos aminoglucósidos y β -lactámicos (Tablas 1 y 2). Estos resultados y los reordenamientos genéticos obtenidos con el análisis de Mauve (Fig. 2) indicaron que el plásmido-fago está evolucionando hacia una amplia gama de resistencia a los antibióticos modernos en diferentes regiones del mundo. Ante todo, la presencia de fagoplásmidos portadores de

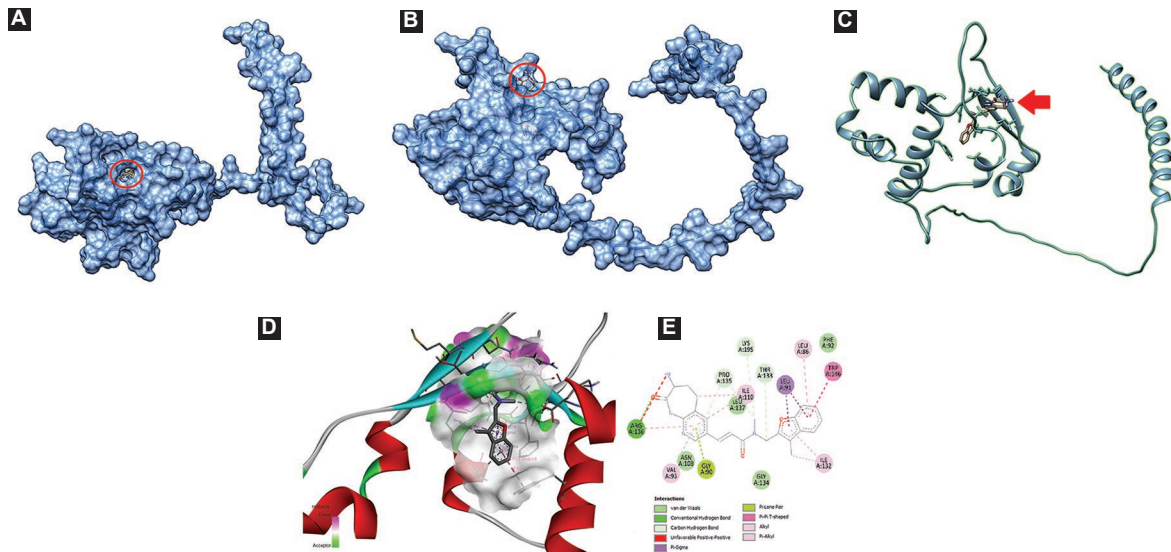


Figura 6. La visualización ilustra el análisis de acoplamiento de la unión del derivado de fabimicina con la proteína de replicación A. **A:** vista superior de la superficie indicada en círculo rojo. **B:** vista lateral de la superficie indicada en círculo rojo. **C:** la interacción entre el derivado de fabimicina y la proteína de replicación A indicada por una flecha roja. **D:** representación de los enlaces de hidrógeno formados durante la interacción. **E:** representación 2D que detalla las uniones del derivado de fabimicina con el sitio activo de la proteína de replicación A.

genes de resistencia antibiótica en China e India coincide con la investigación sobre resistencia antibiótica emergente en estos dos países^{34,35}. Se ha mencionado en estudios previos que existe un uso intensivo de antibióticos en alimentos, ganadería y farmacia en estos países^{36,37} y podría concluirse que esta es la razón principal de la rápida evolución bacteriana debido a la presión antimicrobiana. El hecho de que la mayoría de estos datos de secuenciación del genoma completo (SGC) sean de los últimos 4 años (Tabla 1) y la mitad de los 15 plásmidos seleccionados aleatoriamente porten genes de resistencia antibiótica (Tabla 2). Por su parte, la bacteria huésped podría definirse como hipervirulenta.

Tal y como se ha descrito en estudios previos, los fagos son partículas extrañas e inmunogénicas capaces de provocar respuestas inmunes humores y desencadenar la producción de anticuerpos antifágicos^{16,38-40}. Además, Sweere et al.⁴¹ informaron que un bacteriófago ligado a *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) desencadena mecanismos de defensa antiviral en humanos y dificulta la eliminación de infecciones bacterianas. Estos resultados indican que el compromiso entre las células inmunes y la Pa infectada por fago provocó la síntesis de ARN de fago, lo cual sugiere que un bacteriófago natural y no alterado podría ser capaz de producir ARNm dentro de células humanas.

Los resultados de los estudios de acoplamiento en este estudio indican que el derivado de fabimicina

podría interrumpir la maquinaria de replicación tanto del fagoplásmido como de la bacteria. Un estudio previo también confirmó que la fabimicina resultó ser un prometedor candidato a antibiótico, eficaz contra más de 200 aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*, incluido un modelo desafiante de infección del tracto urinario⁴². Este fármaco candidato se centra en la enzima FabI, una enoil-acil-proteína portadora reducida que cataliza el paso limitante de la velocidad en la biosíntesis de ácidos grasos bacterianos⁴³.

Dirigirse a una región invariante del genoma podría ser un punto crítico para el diseño de fármacos. Según estudios ya realizados, la región diana podría seleccionarse en el genoma^{15,16,40,44-46}. Estos resultados indicaron que el desarrollo de fármacos eficaces y de bajo coste laboral podría ser posible en cualquier región genómica diana si las secuencias invariantes están disponibles.

La RAM es un problema internacional de primer orden. En 2019, el número de muertes en todo el mundo asociadas a RAM alcanzó los 1,27 millones. En ese año, la RAM podría haber provocado 5 millones de muertes, y 1 de 5 cinco de las personas fallecidas por RAM eran niños menores de 5 años⁴⁷. En 2015, el *European Center for Disease Prevention and Control* calculó que la Unión Europea y el Espacio Económico Europeo experimentaron 671.689 infecciones secundarias a bacterias resistentes a los

antibióticos provocando un total de 33.110 muertes. La mayoría se adquirieron en entornos médicos⁴⁸. El desarrollo de nuevos métodos para combatir la RAM es un objetivo primordial en los sistemas de atención médica sostenibles⁴⁹.

Estudios recientes indican que los fagoplásmidos son prevalentes y transfieren una amplia variedad de genes de resistencia a antibióticos clínicamente significativos entre bacterias^{30,50}. A pesar de su importancia ecológica, la mayoría de estos elementos no han sido caracterizados y su evolución como fagoplásmidos sigue siendo poco comprendida. Se necesitan más estudios multidisciplinarios con la colaboración de medicina, farmacología y bioinformática para el seguimiento continuo de la RAM y el desarrollo de nuevos tratamientos *in silico* e *in vitro*.

Aunque este estudio evaluó un pequeño número de fagoplásmidos, los datos proporcionados contribuyen a la comprensión de la epidemiología molecular de los fagoplásmidos mediadores de resistencia en varios países. En los últimos años, las técnicas de SGC baratas y rápidas se han aplicado con éxito para caracterizar la resistencia a antibióticos entre las cepas de *K. pneumoniae*. Se necesita una base de datos completa de genomas de *K. pneumoniae* en cada país para una comprensión completa de la plasticidad genómica de estos organismos, lo cual mejoraría, notablemente, el seguimiento de la resistencia antibiótica entre las distintas cepas.

Conclusiones

Este estudio de fagoplásmidos de *K. pneumoniae* identificó una amplia gama de genes de resistencia a antibióticos clínicamente importantes. Los estudios filogenéticos mostraron que el origen principal de estos fagoplásmidos pertenece a India o China. Estos fagoplásmidos podrían afectar la gravedad y la incidencia de las infecciones por *K. pneumoniae*. El análisis de Mauve indicó que la región que codifica la proteína de replicación A es genéticamente estable con bajas variaciones y podría ser un punto objetivo para el diseño de nuevos fármacos. Además, los estudios de acoplamiento molecular indicaron que un derivado de fabimicina dirigido a la proteína de replicación A podría utilizarse tanto contra los fagoplásmidos como contra su huésped *K. pneumoniae*. Futuros estudios *in vitro* y ensayos clínicos podrían confirmar estos hallazgos y también ampliar nuestro conocimiento sobre los fagoplásmidos y los nuevos tratamientos contra las infecciones por *K. pneumoniae*.

Financiamiento

El estudio ha sido apoyado por la *Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit* (Nº de Proyecto: BYP-2018-28094).

Agradecimientos

El artículo está dedicado a los pacientes con neumonía. El autor desea agradecer a dos profesoras, E. Şeküre-Nazlı-Arda y Ö Baysal, por sus comentarios y sugerencias sobre el manuscrito. Los gráficos y análisis moleculares se realizaron con UCSF Chimera, desarrollado por el *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics* de la *University of California*, San Francisco (California, EE.UU.) con el apoyo de NIH P41-GM103311.

Conflicto de intereses

El autor no tiene intereses en conflicto.

Consideraciones éticas

Protección de seres humanos y animales. El autor declara que no se realizaron experimentos con seres humanos ni animales para esta investigación.

Confidencialidad, consentimiento informado y aprobación ética. El estudio no involucra datos personales de pacientes ni requiere aprobación ética. Las directrices SAGER no son aplicables.

Declaración sobre el uso de inteligencia artificial. El autor declara que no se utilizó inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito.

Material suplementario

El material suplementario se encuentra disponible online en el siguiente enlace: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.28397756>. DOI: 10.24875/GMM.M25001011. Este material es provisto por el autor de correspondencia y publicado online para el beneficio del lector. El contenido del material suplementario es responsabilidad única de los autores.

Referencias

1. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:4.
2. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella pneumoniae*. In: StatPearls. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk519004> [Last accessed on 2025 Jan 09].

3. WHO. Antimicrobial Resistance, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - Global Situation. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease/outbreak/news/item/2024-don527> [Last accessed on 2025 Jan 09].
4. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: microbiology key points for clinical practice. *Int J Gen Med*. 2019;12:437.
5. Akinola OT, Oyebamiji AK, Oke DG, Adekunle DO, Olanrewaju AA, Akindelu SA. *In silico* analysis on binding action of beta-lactam drugs against TEM and SHV class a beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae*. *Discov Appl Sci*. 2024;6:196.
6. Lam MM, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat Commun*. 2021;12:4188.
7. Pranavathiyan G, Pan A. Prediction of essential proteins of *Klebsiella pneumoniae* using integrative bioinformatics and systems biology approach: unveiling new avenues for drug discovery. *OMICS*. 2024;28:138-47.
8. Fortier LC, Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*. 2013;4:354-65.
9. Nang SC, Lu J, Yu HH, Wickremasinghe H, Azad MA, Han M, et al. Phage resistance in *Klebsiella pneumoniae* and bidirectional effects impacting antibiotic susceptibility. *Clin Microbiol Infect*. 2024;30:787-94.
10. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:2640-4.
11. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:3895-903.
12. Wishart DS, Han S, Saha S, Oler E, Peters H, Grant JR, et al. PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Res*. 2023;51:W443-50.
13. Zhao J, Han J, Lin YW, Zhu Y, Aichem M, Garkov D, et al. PhageGE: an interactive web platform for exploratory analysis and visualization of bacteriophage genomes. *Gigascience*. 2024;13:giae074.
14. Darling AE, Mau B, Perna NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One*. 2010;5:e11147.
15. Baysal Ö, Silme RS, Karaaslan İÇ, Ignatov AN. Genetic uniformity of a specific region in SARS-CoV-2 genome and repurposing of N-acetyl-d-glucosamine. *Fresenius Environ Bull*. 2021;30:2848-57.
16. Silme RS. Screening for a Stable Region in the T7 Phage Genome and Repurposing Riboflavin as an Anti-Phage Molecule. Geneva: Zenodo; 2024.
17. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3784-8.
18. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015; 12:7-8.
19. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*. 2003;31: 3381-5.
20. Liu Y, Grimm M, Dai WT, Hou MC, Xiao ZX, Cao Y. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein-ligand blind docking. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41:138-44.
21. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25:1605-12.
22. Biovia DS. Discovery Studio Visualizer. San Diego; 2019. Available from: <https://www.3ds.com/products/biovia> [Last accessed on 2002 Jul 09].
23. Schüttelkopf AW, Van Aalten DM. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004;60:1355-63.
24. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multi-threading. *J Comput Chem*. 2010;31:455-61.
25. Schrödinger LL. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.1; 2024. Available from: <https://www.pymol.org> [Last accessed on 2002 Jul 09].
26. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res*. 2011;39 Suppl 2:W270-7.
27. Mahéault AC, Kemble H, Magnan M, Gachet B, Roche D, Le Nagard H, et al. Advantage of the F2:A1:B- IncF pandemic plasmid over IncC plasmids in *in vitro* acquisition and evolution of bla_{CTX-M} gene-bearing plasmids in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e01130-19.
28. Rocha-Gracia RD, Lozano-Zarain P, Gutiérrez Cázarez Z, Alonso CA, Brambila E, Torres C, et al. IncFIB plasmids carrying the resistance gene bla_{CTX-M-15} in ESBL-producing *Escherichia coli* clones from pediatric patients. *J Infect Dev Ctries*. 2022;16:500-6.
29. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:565-91.
30. Cai M, Pu B, Wang Y, Lv L, Jiang C, Fu X, et al. A plasmid with conserved phage genes helps *Klebsiella pneumoniae* defend against the invasion of transferable DNA elements at the cost of reduced virulence. *Front Microbiol*. 2022;13:827545.
31. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 156500174; 2025. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156500174> [Last accessed on 2025 Jan 03].
32. Hergenrother PJ, Parker EN, Hung D, Serrano-Wu M, Lee KK. FABI Inhibitors for Gram-Negative Pathogens (WO2022187329); 2021. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=wo2022187329> [Last accessed on 2025 Jan 09].
33. Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Group Co., Ltd. A Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of TQA3810 Tablets in Combination non Combination with Nucleoside (Acid) Analogues in Patients with Primary Treated Chronic Hepatitis B; 2024. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/nct06566248> [Last accessed on 2025 Jan 09].
34. Kumar SG, Adithan C, Harish BN, Sujatha S, Roy G, Malini A. Antimicrobial resistance in India: A review. *J Nat Sci Biol Med*. 2013;4:286-91.
35. Qu J, Huang Y, Lv X. Crisis of antimicrobial resistance in China: now and the future. *Front Microbiol*. 2019;10:2240.
36. Taneja N, Sharma M. Antimicrobial resistance in the environment: the Indian scenario. *Indian J Med Res*. 2019;149:119-28.
37. Wu Z. Antibiotic Use and Antibiotic Resistance in Food-Producing Animals in China. OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers, No. 134, Paris: OECD Publishing; 2019.
38. Sulakvelidze A, Barrow P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: Kutter E, Sulakvelidze A, editors. Bacteriophages, Biology and Applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005. p. 335-80.
39. Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, et al. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood. *Viruses*. 2015;7:4783-99.
40. Silme RS. Repurposing Pheophorbide a as an Antiviral Molecule for Targeting a Stable Region in the Human Papillomavirus Type 16 Genome. Geneva: Zenodo; 2024.
41. Sweere JM, Van Belleghem JD, Ishak H, Bach MS, Popescu M, Sunkari V, et al. Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science*. 2019;363:eaat9691.
42. Parker EN, Cain BN, Hajian B, Ulrich RJ, Geddes EJ, Barkho S, et al. An iterative approach guides discovery of the fabi inhibitor fabimycin, a late-stage antibiotic candidate with *in vivo* efficacy against drug-resistant gram-negative infections. *ACS Cent Sci*. 2022;8:1145-58. Erratum in: *ACS Cent Sci*. 2022;8:1362.
43. Yao J, Rock CO. Resistance mechanisms and the future of bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FAB) antibiotics. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6:a027045.
44. Baysal Ö, Abdul Ghafoor N, Silme RS, Ignatov AN, Kniazeva V. Molecular dynamics analysis of N-acetyl-D-glucosamine against specific SARS-CoV-2's pathogenicity factors. *PLoS One*. 2021;16:e0252571.
45. Baysal Ö, Silme RS. Utilization from computational methods and omics data for antiviral drug discovery to control of SARS-CoV-2. In: Kumar V, editor. Origin and Impact of COVID-19 Pandemic Originating from SARS-CoV-2 Infection across the Globe. London: IntechOpen Limited; 2021. p. 1-15.
46. Ghafoor NA, Kirboğa KK, Baysal Ö, Süzek BE, Silme RS. Data mining and molecular dynamics analysis to detect HIV-1 reverse transcriptase RNase H activity inhibitor. *Mol Divers*. 2024;28:1869-88.
47. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399:629- 55. Erratum in: *Lancet*. 400:1102.
48. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19:56-66.
49. Aslam B, Asghar R, Muzammil S, Shafique M, Siddique AB, Khurshid M, et al. AMR and sustainable development goals: at a crossroads. *Glob Health*. 2024;20:73.
50. Pfeifer E, Bonnin RA, Rocha EP. Phage-plasmids spread antibiotic resistance genes through infection and lysogenic conversion. *mBio*. 2022; 13:e0185122.