



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICA

Análisis de la expresión y purificación de
microvesículas a partir de aislados clínicos de
Leclercia adecarboxylata

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
ÁLVARO ASAF GUERRA MARTÍNEZ

DIRECTOR:
DR. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

CO-DIRECTOR:
DRA. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA



MES Y AÑO



Agradecimientos

Dedicatoria

Contenido

Índice de tablas e ilustraciones	5
1. Introducción	7
1.1. Microvesículas y su participación en la virulencia	10
2. Antecedentes	13
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivo general.	17
6. Objetivos particulares	17
7. Materiales y métodos	17
7.1 Resembrado de cepas de aislados clínicos de <i>L. adecarboxylata</i> y crio-preservación.	17
7.2 Producción de OMV's.	18
7.3 Purificación y extracción de microvesículas por centrifugación diferencial y filtración. ...	18
7.4 Antibiogamas de <i>Leclercia adecarboxylata</i>	19
7.5 Sobreexpresión de microvesículas.	19
7.6 Obtención de extractos proteicos totales y de microvesículas mediante tratamiento con buffer RIPA.	19
7.7 Preparación de las muestras para realizar SDS-PAGE.....	19
7.8 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. Western Blot.....	20
7.9 Inmunofluorescencia indirecta en OMVs	20
8. Resultados	21
8.1 Purificación de OMVs	21
8.2 Antibiogamas en <i>Leclercia adecarboxylata</i>	22
8.3 Sobreexpresión de OMVs.	23
8.4 Perfil proteico de OMVs de <i>Leclercia adecarboxylata</i>	24
8.5 Western Blot.	26
8.6 Inmunofluorescencia indirecta en OMVs.	30
9. Discusión	32
10. Conclusiones	40
11. Perspectivas	40
12. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos	41
13. Bibliografía	44

Índice de tablas e ilustraciones

Tablas

- **Tabla 1.** Perfil bioquímico de *Leclercia adecarboxylata* y *Escherichia coli* (Stock *et al.*, 2004). Subrayado se encuentran las pruebas bioquímicas que diferencian a un microorganismo del otro. [\(Página 9\)](#)
- **Tabla 2.** Componentes para la preparación de medio Luria-Bertani (LB). [\(Página 18\)](#)
- **Tabla 3.** Perfil de resistencia a antimicrobianos en aislados clínicos de *Leclercia adecarboxylata*. Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Abreviaciones y concentraciones: Amikacina (AK) 30 mcg, Ampicilina (AM) 10 mcg, Carbencilina (CB) 100 mcg, Cefalotina (CF) 30 mcg, Cefotaxima (CFX) 30 mcg, Ciprofloxacino (CPF) 5 mcg, Cloranfenicol (CL) 30 mcg, Gentamicina (GE) 10 mcg, Netilmicina (NET) 30 mcg, Nitrofurantoína (NF) 300 mcg, Norfloxacino (NOF) 10 mcg y Sulfametoxazol / Trimetropim (STX) 25 mcg. [\(Página 24\)](#)
- **Tabla 4.** Proteínas inmunogénicas candidatas presentes en extractos totales bacterianos y extractos de OMVs. Con base a los ensayos de Western Blot se proponen proteínas con peso de entre 60 y 65 kDa. [\(Página 28\)](#)

Ilustraciones

- **Ilustración 1.** Tinción de Gram de *Leclercia adecarboxylata* y OMVs de Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Encerrado en círculo rojo se muestran las OMVs expresadas, las cuales presentan morfología homogénea. a) Cepa La.008, b) Cepa La. 012, c) Cepa La.028 y d) Cepa La.029. Imágenes a 100x y zoom digital. [\(Página 21\)](#)
- **Ilustración 2.** Tinción de Gram de OMVs. Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Se observan OMVs después de su purificación, las cuales presentan morfología esférica y formación de agrupamientos, por otro lado, no se observa la presencia de bacterias contaminantes. a) La.008, b) La. 012, c) La.028 y d) La.029. Imágenes a 100x y zoom digital. [\(Página 22\)](#)
- **Ilustración 3.** Sobreexpresión de OMVs. Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Se observan OMVs después de su purificación, no se observa la

presencia de bacterias contaminantes. a) La.008, b) La. 012, c) La.028 y d) La.029. Imágenes a 100x y zoom digital. ([Página 24](#))

- **Ilustración 4.** Comparación en la expresión de microvesículas por dos métodos (limitación de nutrientes y presencia de antibiótico en dosis subletal.). Cepa La.008. Se observa una notable diferencia en la producción de OMVs entre los dos métodos empleados después de su purificación, no se observa la presencia de bacterias contaminantes. a) OMVs purificadas, producidas por La.008 en medio líquido con agitación constante por 72 hrs.; b) OMVs purificadas, producidas por La.008 en medio líquido con ampicilina, en agitación constante por 72 hrs. Imágenes a 100x y zoom digital. ([Página 24](#))
- **Ilustración 5.** SDS-PAGE de extractos totales bacterianos y de OMVs. Extractos totales bacterianos, carriles 1-4; Extractos OMV, carriles 5-8. Se identifican bandas diferenciales entre extractos totales bacterianos y extractos de OMV. El perfil proteico entre las diferentes cepas, tanto de extractos totales bacterianos como de OMV, son similares. PM, marcador de peso molecular; Extractos totales bacterianos: La. 008 (1), La. 012 (2), La. 028 (3), La. 029 (4); Extractos OMV: La. 008 (5), La. 012 (6), La. 028 (7), La. 029 (8). ([Página 26](#))
- **Ilustración 6.** Ensayo de Western blot. Anticuerpo primario policlonal anti-OMVsKp 1:1000; Anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina 1:5000. Se identifican bandas inmunogénicas con peso molecular de ~65 kDa y ~60kDa. Extractos totales bacterianos: La. 008 (1), La.012 (2), La.028 (3) y La.029 (4); Extracto OMV: La. 008 (5), La.012 (6), La.028 (7) y La.029 (8). ([Página 28](#))
- **Ilustración 7.** Inmunofluorescencia indirecta en OMVs. Las OMVs se aprecian solas o en agrupamientos en forma de anillo. Imágenes a 100x y zoom digital. ([Página 31](#))
- **Ilustración 8.** Inmunofluorescencia indirecta en bacteria, *Leclercia adecarboxylata*. Anticuerpo primario 1:1000 (anticuerpos heterólogos anti-OMVs de *Klebsiella pneumoniae*); Anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FITC 1:5000. Se aprecia la proteína inmunogénica presente en la bacteria, además de que su localización se encuentra en la membrana. Imágenes a 100x y zoom digital. ([Página 32](#))

1. Introducción

En el año 2019, el director general de Prevención y Promoción a la Salud del Estado de Jalisco, Mario Márquez Amezcua, confirmó un brote de más de 60 casos de infecciones ocasionadas por *Leclercia adecarboxylata* en al menos 11 hospitales de la zona metropolitana de Guadalajara, así como una defunción asociada. El funcionario comentó que el cuadro clínico que presentaban los pacientes fue fiebre, distermia, escalofrío, leucocitosis, leucopenia, mal estado general, calcitonina elevada e hipoactividad (Garza-González *et al.*, 2021). Anteriormente no se habían conocido brotes con un número importante de casos, por lo cual no se conocía el comportamiento epidemiológico que pudiera tener esta bacteria, solamente algunos casos aislados que se habían reportado en la literatura (Grantham *et al.*, 2015; Lucía Correa *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2015). Las causas relacionadas en un 100% con el contagio por esta bacteria fue que los pacientes, entre los días 13 al 19 de mayo de ese mismo año, recibieron nutrición parenteral. Para la fecha en la que concluyó el brote epidemiológico, acorde a los datos de la secretaria de Salud del Estado de Jalisco, el 2 de julio de 2019, solamente se reportaron 69 afectados, de los cuales se dio de alta de la infección a 67 pacientes y dos se reportaron como defunción, una asociada al patógeno y la otra por diferentes causas (secretaría de Salud del Estado de Jalisco, 2019).

Leclercia adecarboxylata, se ha descrito como un patógeno oportunista en humanos y considerado cómo emergente, con el potencial de causar una infección grave en pacientes tanto inmunodeprimidos como inmunocompetentes, ya que se ha observado la participación de esta bacteria en infecciones polimicrobianas (Sandeep Thirunavukkarasu, Veena Ramaswamy, 2014), lo que sugiere la dependencia de este microorganismo a la microbiota del hospedero para causar una gran variedad de enfermedades, por ejemplo, sepsis nosocomial (Ordóñez-gutiérrez, 2011); peritonitis (Adapa *et al.*, 2019); artritis séptica (Pérez-Moreno *et al.*, 2003); diarrea (Lucía Correa *et al.*, 2012) e infecciones de la vesícula biliar (Merza *et al.*, 2019) y de vías urinarias (J. Li *et al.*, 2021), que además son afecciones características ocasionadas por numerosas especies de enterobacterias.

Algunas de las condiciones que se han reportado que predisponen a una infección por *Leclercia* son la enfermedad de Hirschsprung, inmunosupresión y enfermedades de origen mitocondrial (Sánchez-Códez *et al.*, 2019).

Anteriormente, *L. adecarboxylata* era conocida como *Escherichia adecarboxylata*, es un bacilo aeroanaeróbico, Gramnegativo móvil, mesófilo, oxidasa negativo y flagelado períttrico, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, descrito por primera vez por Leclerc en 1962. Se ha aislado de muestras ambientales, como agua o suelo, así como de alimentos y animales, principalmente del tracto gastrointestinal, de tal modo que es considerada como parte de la microbiota intestinal de los animales, incluyendo a los humanos (Aarab *et al.*, 2021; Alvarado, 2005; Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera (Costa Rica) *et al.*, 2000).

En la actualidad, no se ha establecido bien la relevancia clínica de las infecciones humanas por *L. adecarboxylata* (Spiegelhauer *et al.*, 2019). El pobre número de informes de infección puede conducir a un mal diagnóstico. Algunos estudios mencionan que la incidencia de infecciones por *L. adecarboxylata* es probablemente subestimada debido a la identificación errónea de estas bacterias por parte de los laboratorios de microbiología clínica (Stock *et al.*, 2004), ya que este microorganismo comparte muchas características bioquímicas con *E. coli*, de hecho, en medios de cultivo comúnmente empleados para la diferenciación de bacterias Gramnegativas, por ejemplo, agar sangre, agar EMB, agar MacConkey (Gajdács *et al.*, 2020), las colonias de *L. adecarboxylata* se asemejan a las de *E. coli*.

Como ya se mencionó, las semejanzas en el perfil bioquímico entre estos dos microorganismos son grandes, de ahí la importancia de los avances en las técnicas de cultivo y aislamiento que han llevado a una identificación y diferenciación concisa de *L. adecarboxylata* (Anuradha, 2014).

Las siguientes características bioquímicas se utilizan para la diferenciación de *L. adecarboxylata* de otros miembros del orden como *E. coli* (Stock *et al.*, 2004).

Prueba bioquímica	+/-	
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Escherichia coli</i>
1. Citrato	-	-
2. Lisina-descarboxilasa	-	+
3. H ₂ S	-	-
4. myo-Inositol	-	-
5. D-sorbitol	-	+
6. Lactosa	+	+
7. L-ramnosa	+	+
8. Rafinosa	+	+
9. Esculina	+	+
10. Indol	+	+
11. Voges-Proskauer	-	-
12. Adonitol	+	-
13. D-Melobiosa	+	+
14. Sacarosa	+	+

Tabla 1. Perfil bioquímico de *Leclercia adecarboxylata* y *Escherichia coli* (Stock et al., 2004). Subrayado se encuentran las pruebas bioquímicas que diferencian un microorganismo del otro.

En la actualidad, los avances tecnológicos, en la que los procesos son automatizados y requieren de menor tiempo, han permitido la identificación puntual y oportuna de este y varios patógenos bacterianos más, empleando tecnologías basadas tanto en características bioquímicas (BD Crystal, MicroScan), como métodos biológicos moleculares (PCR, secuenciación de rRNA 16S, etc.) (Aquino et al., 2017) y espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) (Schaumann et al., 2013).

1.1. Microvesículas y su participación en la virulencia

En algunas bacterias Gramnegativas se han descrito procesos de secreción de microvesículas o vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés Outer Membrane Vesicles), que son entidades de origen endocítico rodeadas por membranas esféricas (100 a 300 nm), las cuales se expulsan al medio extracelular a partir de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas (Beveridge, 1999). Su formación se lleva a cabo cuando una porción de la membrana externa (OM) se separa de la superficie bacteriana y encapsula la parte interior del espacio periplásmico (Klimentová & Stulík, 2015). Se ha reportado la presencia de estas entidades en consorcios bacterianos diferentes y su presencia parece ser esencial para la supervivencia bacteriana. Estas microvesículas se encuentran enriquecidas con diferentes componentes celulares como toxinas, carbohidratos, lípidos, proteínas, factores de virulencia y ácidos nucleicos, y desempeñan un papel fundamental en las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-huésped.

El papel que presentan estas microvesículas en la interacción con otras células está mediada por varios factores, uno de estos son las proteínas, las cuales aumentan las capacidades invasivas promoviendo la internalización del patógeno a las células del hospedero.

Según la naturaleza y composición de las OMVs, será la manera en la que participará en las diferentes interacciones de la bacteria, así como pueden ayudar a la adherencia y la internalización, también pueden intervenir en las respuestas al estrés, lo que implica la formación de biopelículas, la drogoresistencia y la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedero (Ellis & Kuehn, 2010)

En 2020, Jarzab y colaboradores, describen la importancia de las OMVs en la patogénesis de *Helicobacter pylori*, bacteria gramnegativa asociada a la inducción y progresión de trastornos gástricos, como gastritis, ulceración en estómago y duodeno, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y adenocarcinoma gástrico (Jarzab *et al.*, 2020; Waskito *et al.*, 2018). Hay algunos estudios que mencionan la formación de biopelículas durante la colonización de la mucosa gástrica humana ya que se han obtenido biopsias, las cuales presentan capas

densas que asemeja a las bacterias asociadas a la biopelícula en la superficie de la mucosa de los pacientes positivos para *H. pylori*, sin embargo, no se ha estudiado a profundidad su composición y genes asociados. Los estudios *in vitro* de la formación de biopelículas por parte de este patógeno indican la participación de las OMV, aún no está claro qué mecanismos tanto moleculares como celulares están involucrados (Grande *et al.*, 2015). Un estudio informó que la capacidad de formación de biopelículas de *H. pylori* dependía de las OMVs que mediaban los contactos directos de célula a célula entre las bacterias (Yonezawa *et al.*, 2011). La adición de microvesículas de un aislado clínico con fuerte actividad de formación de biopelícula a cultivos de *H. pylori* mejoró significativamente la capacidad de formación de biopelículas (Yonezawa *et al.*, 2009). Una proteína de 22 kD no identificada (Yonezawa *et al.*, 2011) y una proteína omp20 presentes en estas OMV se describieron como factores importantes para este suceso. Otro estudio ha demostrado que las OMV de *H. pylori* aisladas de una biopelícula contenían ADN extracelular (eDNA), en comparación con las aisladas de cultivos planctónicos de la misma cepa, de este modo se le atribuye a las OMV la capacidad de prevenir la degradación del eDNA, lo que podría apoyar o modular la formación de biopelículas o bien, presentar un papel en el intercambio intercelular de material genético. Por otro lado, se identificó la enzima anhidrasa carbónica en extractos de microvesículas, se cree que esta enzima en coacción con el eDNA podría estabilizar la formación de biopelículas cuando estas se encuentran liberadas en el medio (Ronci *et al.*, 2019). En general, en diferentes géneros bacterianos las vesículas son abundantes en las biopelículas naturales, y se ha observado que el ADN unido a la superficie de la VME parece ser un componente de puente electrostático que es fundamental para las interacciones de la membrana vesícula-bacteria-matriz de biopelícula (Schooling & Beveridge, 2006). Es bien sabido que *H. pylori* expresa antígenos de Lewis en su membrana, este mimetismo molecular favorece su virulencia. Dado que las OMVs producidas por *H. pylori* también contienen estos antígenos de Lewis en su lipopolisacárido (LPS), se ha propuesto que las microvesículas podrían contribuir a la estimulación crónica del sistema inmunitario del hospedero (Hynes *et al.*, 2005).

Como ya se mencionó, una gran variedad de moléculas están asociadas a estas OMV's. Se ha descubierto que las vesículas liberan toxinas activas a las células hospederas (Ellis & Kuehn, 2010). Kolling y colaboradores demostraron, mediante inmunotransferencia, que la toxina Shiga está presente dentro de las vesículas de membrana externa producidas por las células O157:H7 (Kolling *et al.*, 1999), lo cual permite entre ver la ventaja que estas microvesículas le otorgan a la cepa de origen al momento de establecer una infección. Algunos de los componentes de la membrana externa de las microvesículas incluyen adhesinas que permiten que las OMV interactúen con las células hospederas, las cuales, además, pueden incluir proteasas y moléculas de señalización. Por ejemplo, las vesículas de *Pseudomonas* contienen, quinolonas antimicrobianas, enzimas asociadas a la virulencia, y moléculas con participación en el *quorum-sensing* (Z. Li *et al.*, 1998). Las proteasas activas que conforman a las OMV pueden degradar las células hospederas, por ejemplo, las microvesículas de *Treponema denticola*, un patógeno periodontal, tienen proteasas activas que confieren características de daño a las células hospederas, similares a las que ocasiona la bacteria que las origina (Chi *et al.*, 2003; Rosen *et al.*, 1995). Además, en filtrados de sobrenadantes del cultivo de *Neisseria meningitidis* se detectaron la presencia de factores procoagulantes y fibrinolíticos para los monocitos humanos (Schlichting *et al.*, 1993). Incluso, se ha observado que las microvesículas de algunas especies de *Neisseria* pueden unirse directamente e incluso destruir los factores bactericidas del hospedero (Pettit & Judd, 1992).

Las OMVs producidas por enterobacterias colonizadoras pueden ser absorbidas tanto por células epiteliales como por macrófagos, lo cual puede desencadenar una respuesta innata inmediata del hospedero; esta respuesta de las células humanas a los productos bacterianos secretados es un desencadenante bien conocido de la cascada inflamatoria. Alaniz y colaboradores demostraron que las OMV de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* son potentes estimuladores de citocinas proinflamatorias y de la activación de las células del sistema inmune, ya que, activan los macrófagos y las células dendríticas lo cual aumenta los niveles de expresión del complejo principal de histocompatibilidad de superficie de clase II (MHC-II), así como la producción de mediadores proinflamatorios, el factor de necrosis tumoral

alfa (TNF- α) y la interleucina-12 (IL-12), además, activaron a las células T CD4+, lo que indica que los componentes del antígeno proteico de las vesículas fueron procesados y presentados de manera efectiva por las células presentadoras de antígeno (Alaniz *et al.*, 2007; Ellis & Kuehn, 2010).

Otra bacteria de la cual se ha reportado la presencia de microvesículas es *Acinetobacter baumannii*, la cual es una de las principales causas de infección nosocomial. Algunos componentes bacterianos de este microorganismo que se encuentran involucrados en la patogénesis y la inducción de la respuesta inmune del huésped durante la infección, como la proteína A de la membrana externa (OmpA), las vesículas de la membrana externa y los LPS (Chen, 2020). La actividad de las OMV de *Acinetobacter baumannii* en el sistema inmune del hospedero durante una infección ha sido descrita. Estas OMV, por medio de los macrófagos, son reconocidas a través del receptor TLR4, lo que provoca activación de la producción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, por lo tanto, este microorganismo puede aumentar su virulencia y reclutar más neutrófilos (Z. Liu & Xu, 2022; Pires & Parker, 2019). Estudios en ratones han demostrado que las OMV de *A. baumannii* aumentan la liberación de quimiocinas en los pulmones, lo que condujo a reclutamiento masivo de neutrófilos en los alvéolos provocando daño epitelial alveolar, así como obstrucción de las vías respiratorias; del mismo modo, otro grupo de investigación encontró que después de la administración intranasal de diferentes dosis de microvesículas las concentraciones de quimiocinas y citocinas en líquido de lavado broncoalveolar (BALF) aumentaron de manera proporcional (Z. Liu & Xu, 2022; Marion *et al.*, 2019).

2. Antecedentes

Hasta el momento no se ha descrito la producción de microvesículas por parte de *Leclercia adecarboxylata*, sin embargo, se ha reportado la producción de OMV's por parte de géneros bacterianos relacionados filogenéticamente.

Enterobacter cloacae es una bacteria gramnegativa relacionada filogenéticamente a *Leclercia*, este microorganismo se ha asociado a una gran variedad de hábitats

ambientales, se ha recuperado del suelo y agua, es considerada además una especie endofítica fitopatogena para varias especies de plantas, por otro lado, *E. cloacae* es parte de la microbiota intestinal animal y humana, aunque también es considerada como un patógeno oportunista (Davin-Regli *et al.*, 2019). Las especies de *Enterobacter* son miembros del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*) especies que se describen como la principal causa de infecciones nosocomiales multidrogorresistentes. A pesar de la relevancia de *E. cloacae* como patógeno nosocomial, aún no se conocen en su totalidad los mecanismos y factores de virulencia que contribuyen a la enfermedad asociada a esta especie; esto podría deberse a la escasez de información disponible (Davin-Regli *et al.*, 2019). Se conoce que su capacidad para formar biopelículas y secretar diversas citotoxinas (enterotoxinas, hemolisinas, toxinas formadoras de poros) son importantes para su patogenicidad, aunado a esto, en los últimos años se ha reportado la presencia de vesículas de membrana externa en *E. cloacae*, lo cual podría ser uno de sus mecanismos utilizado para causar infecciones, aún no se ha descrito en la literatura como participan estas microvesículas, sin embargo, conociendo la función que estas OMVs realizan en otros microorganismos, como, otorgarle a la bacteria tolerancia al estrés o modular el sistema inmunológico, potenciar la virulencia y la colonización de tejidos en el hospedero, se teoriza que podría ser una herramienta útil para *E. cloacae* y su capacidad infectiva, así como de resistencia a antibióticos (Band & Weiss, 2014). En contraste, se han encontrado OMVs de *E. cloacae* en cepas aisladas de platanos y se ha asociado a esta bacteria con la capacidad de promover el crecimiento y la salud de los cultivos, por lo cual, habría que realizar más estudios para otorgarle funciones más específicas a las microvesículas de *E. cloacae* (Macedo-Raygoza *et al.*, 2019).

Otro microorganismo al cual se le adjudica la producción de microvesículas y que están relacionadas con *Leclercia*, son las del género *Pantoea*, estos microorganismos se encuentran frecuentemente en una amplia variedad de sitios, incluyendo plantas, insectos, animales, humanos y suelo. Varias especies de *Pantoea* son patógenos vegetales, sin embargo, también se han aislado a partir de

muestras clínicas humanas (Nadarasah & Stavrinides, 2014). Se han obtenido muestras de *Pantoea agglomerans* específicamente, de pacientes pediátricos con bacteriemia, osteomielitis, peritonitis, neumonía, artritis séptica y septicemia (Cruz *et al.*, 2007). La relevancia de este microorganismo radica en el sector agroambiental por sus características de promoción del crecimiento o de control biológico. En este microorganismo se ha reportado, de manera limitada la producción de microvesículas, las cuales presentan funciones no tan comunes en bacterias Gramnegativas, ya que se ha observado en diferentes estudios sobre *Pantoea agglomerans* y *Pantoea ananatis* que (aunque no son psicrófilas) pueden secretar proteínas nucleantes de hielo (PNH, proteínas de membrana que desencadenan la formación de hielo extracelular) a través de vesículas de membrana externa; con base en lo anterior, se ha propuesto que la secreción de PNH asociada a producción de microvesículas son una herramienta empleada por estas bacterias para prevenir o reducir el criodañó que puede ocasionar los cristales de hielo a nivel intracelular (Zlatkov *et al.*, 2021).

De igual manera, se ha descrito la presencia de OMVs en *Klebsiella pneumoniae* y se han catalogado como nano complejos importantes dentro de las actividades secretoras de la bacteria, debido a que provocan la inducción de la inmunidad innata, incluida la regulación positiva de la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de mediadores proinflamatorios, lo que desencadena una potente respuesta inflamatoria en el hospedero que contribuyen a la patogénesis de la infección (Lee *et al.*, 2015). *K. pneumoniae* es un patógeno Gramnegativo que actúa como oportunistas, infectando a pacientes críticamente enfermos e inmunodeprimidos, es causante de una gran variedad de infecciones asociadas con la atención médica, como neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones del torrente sanguíneo (Martin & Bachman, 2018). Las microvesículas obtenidas a partir de este microorganismo han demostrado la inducción de cambios postranscripcionales en células epiteliales bronquiales humanas, al desregular la expresión de micro RNAs (miRNAs) los cuales presentan un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias del huésped que implican las vías de señalización NF- κ B (miR-223), TLR4 (hsa-miR-21), citoquina (hsa-miR-25) e IL-6

(hsa-let-7g miRNA) (Dell'annunziata *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha demostrado que las vesículas de membrana que carecen de porinas (característica clave de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a los antibióticos) como, OmpK35 y OmpK36, provocan niveles significativamente más bajos de secreción de citocinas proinflamatorias que las vesículas de cepas que expresan una o ambas porinas, es importante señalar que la pérdida de porinas tiene un efecto amplio y significativo en la composición de las OMVs, lo cual repercute directamente en las interacciones con las células fagocíticas, lo que puede afectar la supervivencia bacteriana y las reacciones inflamatorias en el hospedero (Turner *et al.*, 2016).

3. Justificación

Leclercia adecarboxylata es un patógeno emergente oportunista humano, el cual no ha sido estudiado de manera profunda, por lo que se desconocen sus mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia. En los últimos años se ha relacionado con una diversidad de enfermedades, así como de presentar multidrogorresistencia, lo cual aumenta la preocupación por este microorganismo. Del mismo modo, la investigación sobre microvesículas de origen bacteriano es reciente, pues hasta el momento no hay tanta información al respecto, en comparación con otros factores de virulencia como toxinas, cápsula, enzimas, etc. Existen reportes que demuestran la participación de OMV's en la patogénesis de varias enfermedades de origen bacteriano, haciendo destacar como estas microvesículas confieren ventajas ante otras bacterias. La falta de estudios sobre *Leclercia* provoca el desconocimiento acerca de la producción de OMV's por parte de este microorganismo, y, por consiguiente, de la composición molecular de estas mismas. La identificación de generación y secreción de OMVs por parte de la bacteria, es de suma importancia para entender su patogenicidad. Este estudio permitirá describir a las OMVs como un posible factor de virulencia en *Leclercia adecarboxylata*.

4. Hipótesis

Leclercia adecarboxylata es capaz de producir vesículas de membrana externa inmunogénicas bajo ciertas condiciones de estrés *in vitro*.

5. Objetivo general.

Evaluar la capacidad de generación de OMVs en *Leclercia adecarboxylata* y caracterizar molecularmente las microvesículas secretadas

6. Objetivos particulares

1. Identificar las condiciones de expresión y secreción de microvesículas de aislados clínicos de *Leclercia adecarboxylata*.
2. Purificar las microvesículas de *L. adecarboxylata* mediante centrifugación diferencial y filtración.
3. Comparar los perfiles proteicos asociados a microvesículas purificadas y extractos totales bacterianos.
4. Identificar proteínas antigénicas presentes en OMVs de *L. adecarboxylata* mediante un inmunoensayo.

7. Materiales y métodos

7.1 Resembrado de cepas de aislados clínicos de *L. adecarboxylata* y criopreservación.

Se utilizaron 4 cepas de aislados clínicos de *Leclercia adecarboxylata*: L.a. 008, L.a. 012, L.a. 028 y L.a. 029.

Cada una de las cepas se sembraron por estría cruzada en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB) (*Tabla 2*), se etiquetaron y se incubaron a 37°C por 24 horas, a partir de estas colonias obtenidas, se obtuvo una asada y se realizó un cultivo en medio líquido para la posterior expresión de microvesículas, por lo cual, se prepararon matraces con 500 mL de medio LB líquido, los cuales se incubaron por 24 horas a 37°C a 120 rpm, pasado el tiempo, se recuperó una alícuota de 600

microlitros de este cultivo para su crio-preservación a -70°C en medio LB con 20% de glicerol.

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) 1 litro				
Extracto de levadura	Cloruro de sodio	Peptona de caseína	Agua	Bacto-agar
5 gr	10 gr	10 gr	1 litro	15 gr

Tabla 2. Componentes para la preparación de medio Luria-Bertani (LB).

7.2 Producción de OMV's.

Los cultivos en medio líquido anteriormente utilizados para la crio-preservación se emplearon para promover la expresión de microvesículas, de esta forma, los matraces se mantuvieron por 48 horas más, a partir de que se obtuvo la alícuota, en incubación a 37°C a 120 rpm. Pasado 72 horas desde que se cultivó la asada en medio líquido, se realizó tinción de Gram para observar OMVs y bacterias.

7.3 Purificación y extracción de microvesículas por centrifugación diferencial y filtración.

Para cada cultivo de cada cepa se realizó, en primera instancia, una centrifugación a 6000 rpm por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante, el cual fue sometido al mismo tratamiento. Finalmente, el sobrenadante se filtró a través de membranas de nylon con poros de 0.40 y 0.22 micrómetros. Se realizó la precipitación de las OMVs adicionando acetona fría a los filtrados en una proporción 2:1 y se mantuvo a 4°C por 24 horas. Posterior a este tiempo, se centrifugó por 15 min a 6000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y con PBS se recuperó la pastilla obtenida, a esto último, se le realizó una última centrifugación a 13000 rpm a temperatura ambiente (TA), se retiró el sobrenadante y a la pastilla que se obtuvo se le adicionaron 500 microlitros de PBS estéril y se sometieron a luz UV por 15 minutos. Finalmente, en placas de agar LB, a partir de 20 microlitros de cada extracto de OMVs, se realizaron cultivos masivos para realizar prueba de esterilidad incubándolas a 37°C durante 24 horas.

7.4 Antibiógramas de *Leclercia adecarboxylata*.

Se realizaron cultivos masivos en placa Petri para cada cepa y se colocaron sensidiscos para bacterias Gramnegativas. Se dejó en incubación a 37°C por 24 horas.

7.5 Sobreexpresión de microvesículas.

Se realizó de nueva cuenta, por cada cepa, un cultivo en 50mL de medio LB líquido, en las mismas condiciones a los realizados anteriormente, con la única diferencia de que se añadió ampicilina a una concentración de 30 µg/ml con la finalidad de generar una condición de estrés.

7.6 Obtención de extractos proteicos totales y de microvesículas mediante tratamiento con buffer RIPA.

Se tomaron 32.23 µg/µl de OMVs purificadas como de cultivo en medio líquido de *L. adecarboxylata*, a los cuales, por separado se les adicionó 200 µl de buffer RIPA, 20 µl de inhibidores de proteasas y 60 µl de Buffer de carga. Esta mezcla se mantuvo a -4°C durante toda la noche.

7.7 Preparación de las muestras para realizar SDS-PAGE.

Las muestras obtenidas previamente se mantuvieron a 100°C durante 15 min. Posteriormente se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. La electroforesis se llevó a cabo con 25 µl de cada muestra, es decir extractos totales de OMV's y extractos totales bacterianos, y con buffer de corrimiento tris-glicina. La migración se llevó a cabo a 70 V y 150 V, el primer voltaje para el gel concentrador y el segundo para el separador. Este procedimiento se realizó en tres ocasiones y en cada uno se obtuvieron dos geles (replica), uno de ellos se colocó en agitación constante para teñir con azul de Coomassie durante 24 horas; el otro se empleó para la electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. Al gel que se le añadió azul de Coomassie, posteriormente se le adicionó solución desteñidora hasta lograr observar bandas bien definidas.

7.8 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. Western Blot.

Uno de los geles anteriormente generado se utilizó para realizar electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa. Se llevó a cabo por 1h a 70 V, posteriormente la membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche en polvo en PBS. Después las muestras se incubaron con los anticuerpos utilizando como anticuerpo primario, anticuerpos contra OMVs de *K. pneumoniae* producidos en ratón a una dilución 1:1000 el cual se mantuvo por toda la noche a temperatura ambiente (aprox. 15°C). Posteriormente se realizaron 3 lavados con 10 ml de solución de PBS y Tween 20 al 0.05% (PBS-T) en agitación por 10 min cada uno, y se agregó el anticuerpo secundario anti-mouse IgG acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000, se dejó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados más con PBS-T al 0.05% por 10 min cada uno, finalmente para el revelado se empleó como sustrato 1 mL de BCIP/NBT.

7.9 Inmunofluorescencia indirecta en OMVs

Se tomó una alícuota de microvesículas y se lavaron con PBS estéril, posteriormente se fijaron en un portaobjetos, con paraformaldehído por 30 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo, se realizaron lavados con PBS de manera lenta. Se procedió a limpiar con cloruro de amonio por 15 min a TA y de nueva cuenta se lavó con PBS. Lo anterior, se realizó por duplicado para cada cepa, para poder tener muestras bloqueadas y permeabilizadas. Las muestras a bloquear fueron incubadas por 1 h temperatura ambiente con BSA 1%; las muestras a permeabilizar se incubaron primeramente con Triton X-100 al 0.5% por 30 min y después de este tiempo, con BSA al 1% por otros 30 min, todo esto a TA. El total de las muestras se incubaron con el primer anticuerpo anti-OMVsKp a 4°C toda la noche. Al otro día se realizaron lavados con PBS para proceder a incubar con el segundo anticuerpo anti-mouse IgG acoplado a FITC por 1 h a 37°C protegido de la luz. Una vez más, pasado este tiempo se procedió a lavar con PBS. Finalmente se realizó el montaje con 5 µl de Vectashield dejando la muestra lista para observar en microscopio de epifluorescencia.

8. Resultados

Para determinar la capacidad de *L. adecarboxylata* para producir OMVs se realizaron cultivos a partir de diferentes aislados clínicos, los cuales fueron sometidos a un estrés nutricional, esto permitió observar microvesículas secretadas al medio extracelular durante el cultivo *in vitro*. Posterior al tiempo de estrés las bacterias junto con sus OMVs, se observaron por medio de microscopía óptica. Se pudo hacer un análisis morfológico; en todas las microvesículas obtenidas de cada una de las cepas se observaron resultados homogéneos, es decir, entidades esféricas, con una coloración tipo-Gramnegativa y de menor tamaño a las bacterias que las originó, además, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de OMVs entre cada cepa (*Ilustración 1*).

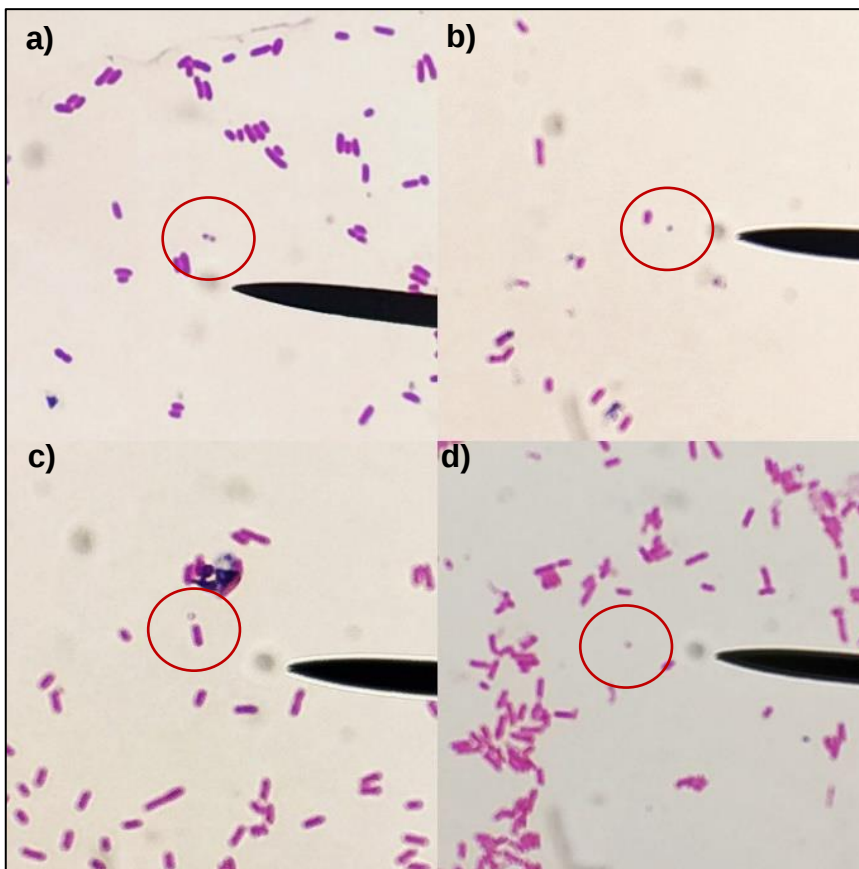


Ilustración 1. Tinción de Gram de Leclercia adecarboxylata y OMVs de Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Encerrado en círculo rojo se muestran las OMVs producidas, las cuales presentan morfología homogénea. a) Cepa La.008, b) Cepa La. 012, c) Cepa La.028 y d) Cepa La.029. Imágenes a 100x y zoom digital.

Para lograr purificar las microvesículas se llevó a cabo una serie de centrifugaciones y filtraciones para lograr separar estas OMVs del contenido celular.

Las OMVs son secretadas al medio extracelular y debido a su tamaño y densidad, la ubicación de estas en un medio líquido se encuentra en el sobrenadante, por lo que, es importante primero realizar centrifugaciones para descartar el precipitado y poder trabajar con el sobrenadante, el cual se encuentra libre de células, este se filtró en membranas de nylon con poros de 0.45 y 0.22 μm para asegurar no acarrear bacterias y se volvió a centrifugar, se recuperó la pastilla obtenida de las centrifugaciones y se procedió a realizar pruebas de esterilidad para confirmar la ausencia de bacterias, se observó que no hubo crecimiento en las placas, indicando que las OMVs purificadas se encontraban estériles (*Ilustración 2*).

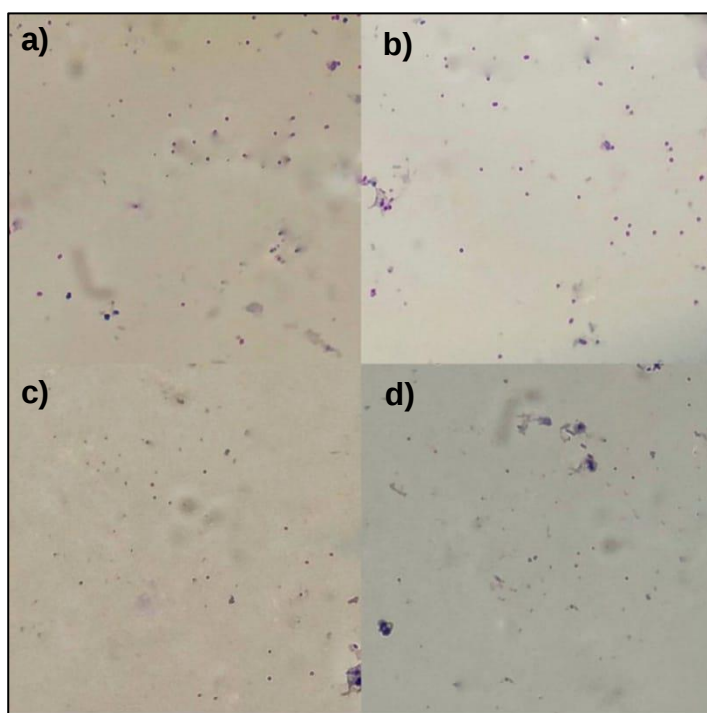


Ilustración 2. Tinción de Gram en OMVs. Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Se observan OMVs después de su purificación, las cuales presentan morfología esférica y formación de cúmulos, por otro lado, no se observa la presencia de bacterias contaminantes. a) La.008, b) La. 012, c) La.028 y d) La.029. Imágenes a 100x y zoom digital.

8.2 Antibigramas en *Leclercia adecarboxylata*.

El estudio microbiológico de la sensibilidad a antimicrobianos de las diferentes bacterias o cepas aisladas tiene como objetivo observar la presencia o ausencia de la resistencia bacteriana, con objeto de evaluar el espectro del antimicrobiano. Este estudio se realizó mediante el antibiograma, que mide la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos *in vitro*. Con este estudio se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico. La interpretación de los resultados del antibiograma (sensible,

intermedio o resistente) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, lo cuales determinan con base en diferentes propiedades tanto microbiológicas como farmacocinéticas, la sensibilidad o resistencia de las diferentes especies bacterianas, o cepas, a cada antimicrobiano (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009). Para cada cepa se realizó un antibiograma, con el fin de obtener su perfil de resistencia (*Tabla 3*). Se observó que todas las cepas son altamente resistentes a los antibióticos administrados por el multisensidisco, por otro lado, se pudo determinar que los antimicrobianos con mejor eficacia en contra de este patógeno es la Nitrofurantoína (NF) y la Gentamicina (GE) ya que en todas las cepas empleadas se lograron apreciar halos de inhibición.

	La. 008	La. 012	La. 028	La. 029
<i>Resistente</i>	AM, CB, CF, CFX, CPF, CL, NET, STX, NOF, AK	AK, AM, CB, CF, CFX, CPF, CL, NET, NF, STX, NOF	AK, AM, CB, CF, CFX, CPF, CL, NET, STX, NOF	AK, AM, CFX, CPF, CL, GE, NET, NOF, STX, CB, CF
<i>Intermedio</i>		GE	NF	
<i>Sensible</i>	NF, GE		GE	NF

Tabla 3. Perfil de resistencia a antimicrobianos por *Leclercia adecarboxylata*. Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Abreviaciones y concentraciones: Amikacina (AK) 30 mcg, Ampicilina (AM) 10 mcg, Carbenicilina (CB) 100 mcg, Cefalotina (CF) 30 mcg, Cefotaxima (CFX) 30 mcg, Ciprofloxacino (CPF) 5 mcg, Cloranfenicol (CL) 30 mcg, Gentamicina (GE) 10 mcg, Netilmicina (NET) 30 mcg, Nitrofurantoína (NF) 300 mcg, Norfloxacin (NOF) 10 mcg y Sulfametoxazol / Trimetropim (STX) 25 mcg.

8.3 Sobreexpresión de OMVs.

Para obtener mayor cantidad de microvesículas se realizó un segundo cultivo de cada cepa, en las mismas condiciones, a excepción de que se agregó antibiótico al medio de cultivo. El antibiótico empleado fue ampicilina, el cual, con base en el antibiograma realizado previamente, el microorganismo es capaz de resistir. Se utilizaron subdosis de ampicilina con la finalidad de inducir un estrés, después de realizar el cultivo, se procedió a centrifugar, filtrar y purificar las OMVs. Se obtuvieron niveles de expresión más altos en comparación con las obtenidas solamente por escasez de nutrientes (*Ilustración 4*). La morfología es la misma entre cada una de las muestras, al igual que las obtenidas con el protocolo inicial (estrés metabólico por escasez de nutrientes) (*Ilustración 3*).

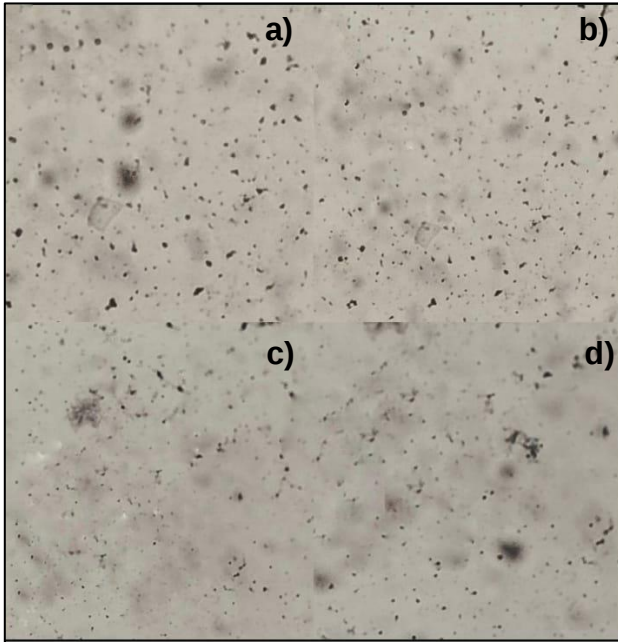
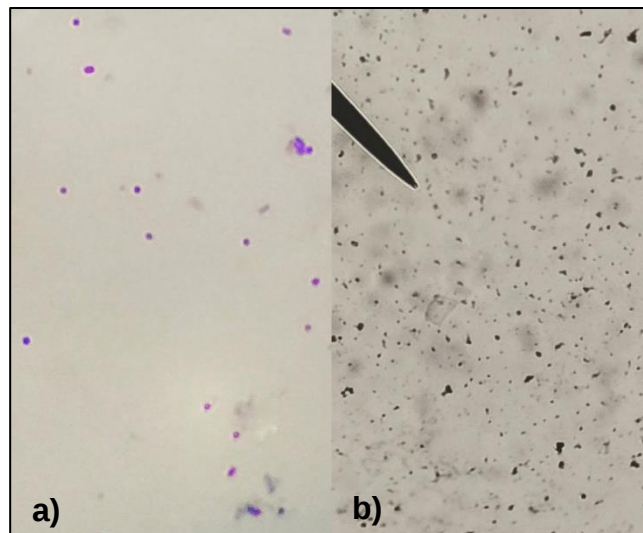


Ilustración 3. Sobreexpresión de OMVs. Cepas La.008, La.012, La.028 y La.029. Se observan OMVs después de su purificación, no se observa la presencia de bacterias contaminantes. a) La.008, b) La. 012, c) La.028 y d) La.029. Imágenes a 100x y zoom digital.

Ilustración 4. Comparación de expresión de microvesículas por dos métodos. Cepa La.008. Se observa una notable diferencia en la producción de OMVs entre los dos métodos empleados después de su purificación, no se observa la presencia de bacterias contaminantes. a) OMVs purificadas, producidas por La.008 en medio líquido con agitación constante por 72 hrs.; b) OMVs purificadas, producidas por La.008 en medio líquido con ampicilina, en agitación constante por 72 hrs. Imágenes a 100x y zoom digital.



8.4 Perfil proteico de OMVs de *Leclercia adecarboxylata*.

La creciente investigación y análisis de las microvesículas ha permitido conocer sus constituyentes principales, como proteínas y lípidos, los cuales varían según la entidad de origen. Con los avances tecnológicos se ha podido realizar perfiles proteómicos y se han identificado una gran cantidad de proteínas vesiculares. Diferentes análisis han demostrado una gran abundancia de proteínas de

membrana externa (Omp) en las OMV como OmpA, OmpC y OmpF, proteínas periplásmicas (AcrA y fosfatasa alcalina) (Jan, 2017). La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida es de las técnicas más importantes ya que permite la separación de una mezcla de proteínas según su peso molecular, además de ser la técnica de entrada para la realización del Western-Blot. El fundamento de la técnica SDS-PAGE es hacer que el movimiento de la proteína en el gel, por acción del campo eléctrico sea exclusivamente proporcional a su peso molecular.

Se decidió evaluar la presencia de un cargo proteico en OMVs de *Leclercia adecarboxylata*. Para poder obtener el perfil proteico de las microvesículas de *L. adecarboxylata* se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Para esto, primeramente, las OMVs purificadas fueron lisadas mediante incubación con buffer RIPA, inhibidores de proteasas y buffer de carga, para exponer las proteínas contenidas en las OMVs. Una vez teniendo las muestras listas, se cargaron en un gel de poliacrilamida y se realizó la migración, este procedimiento se realizó dos veces para obtener dos geles, uno de ellos se colocó en agitación constante para teñir con azul de Coomassie, a este mismo, pasado el tiempo, se le agregó solución desteñidora en varias ocasiones hasta lograr observar bandas bien definidas (*Ilustración 6*). Obtenidas las bandas, se compararon los perfiles proteicos de las 4 cepas, tanto de extractos totales bacterianos como de OMVs. Entre los extractos totales bacterianos (*Carriles 1-4 de la Ilustración 6*) no se encontraron bandas diferenciales entre sí, indicando la igualdad en el cargo proteico entre cada una de las cepas. Entre los extractos de OMVs (*Carriles 5-8 de la Ilustración 6*) de igual manera no se encontraron bandas diferenciales entre sí, sin embargo, comparando extractos totales bacterianos con extractos de microvesículas, si se logran identificar bandas diferenciales, esto es relevante ya que se puede relacionar a un proceso

regulado en lugar de uno al azar, por consiguiente, se podría determinar que el cargo está bien caracterizado.

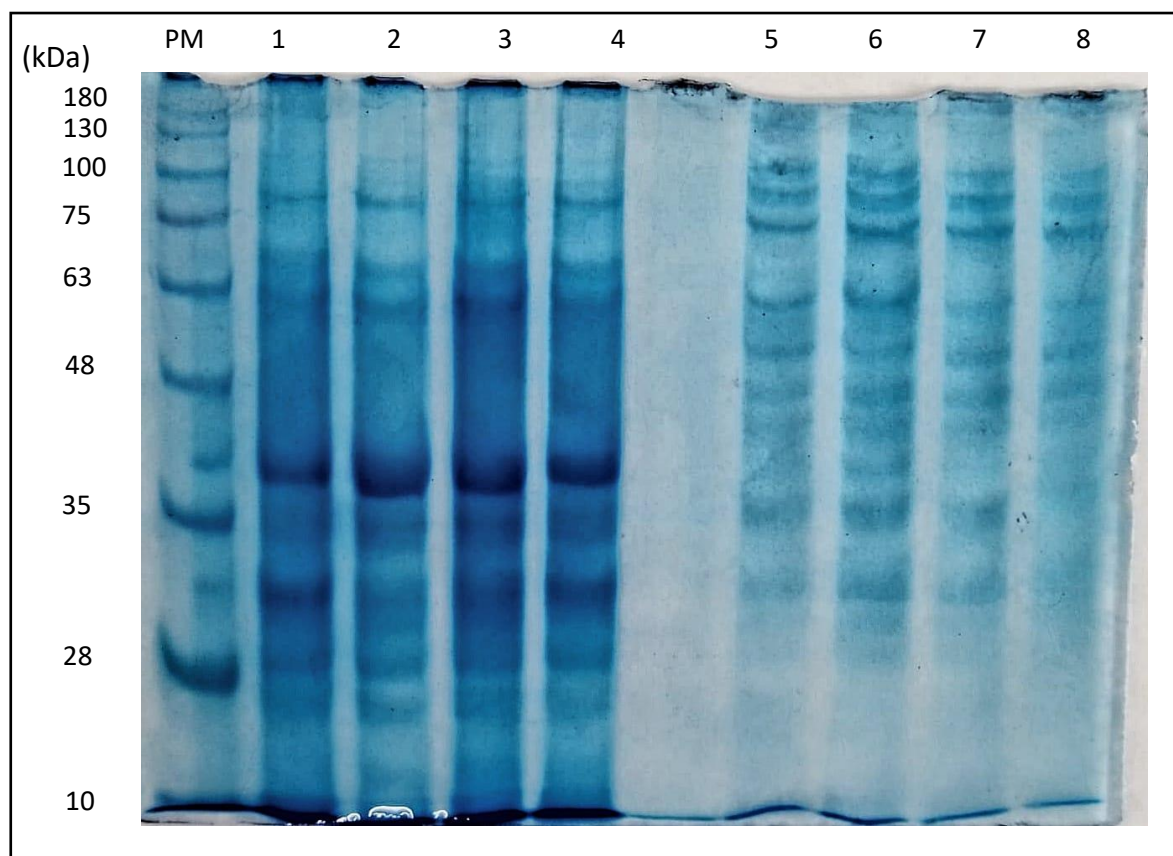


Ilustración 5. SDS-PAGE de extractos totales bacterianos y de OMV. Extractos totales bacterianos, carriles 1-4; Extractos OMV, carriles 5-8. Se identifican bandas diferenciales entre extractos totales bacterianos y extractos de OMV. El perfil proteico entre las diferentes cepas, tanto de extractos totales bacterianos como de OMV, son similares. PM, marcador de peso molecular; Extractos totales bacterianos: La. 008 (1), La. 012 (2), La. 028 (3), La. 029 (4); Extractos OMV: La. 008 (5), La. 012 (6), La. 028 (7), La. 029 (8).

8.5 Western Blot.

El Western Blot es una técnica utilizada para detectar una proteína específica en una muestra dada. Como ya se mencionó, el paso inicial para esta metodología es la electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra, una vez separadas las proteínas, se transfieren del gel a la superficie de una membrana la cual es expuesta a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio. La unión del anticuerpo se detecta usando un marcador, el cual puede ser un anticuerpo secundario acoplado a una molécula capaz de dar una señal colorimétrica visible,

es decir, dentro del espectro visible para el ser humano. En trabajos anteriores realizados en el laboratorio, se ha demostrado la capacidad antigénica que tienen las OMVs, como bien se ha descrito, estas presentan un cargo muy variado, dentro de este cargo se pueden presentar moléculas con inmunogenicidad, las cuales le confieren esta misma característica a la microvesículas. El anticuerpo primario empleado se obtuvo de ratones inmunizados previamente con OMVs de *Klebsiella pneumoniae*, el anticuerpo secundario fue contra IgG producido en ratón acoplado a fosfatasa alcalina. Se identificó 1 banda inmunogénica con peso molecular de ~60 kDa y ~65kDa, en los 4 extractos totales bacterianos y en las 4 OMVs. (Ilustración 7). Lo anterior indica que las proteínas antigénicas presentes en la célula bacteriana de origen, se presentan de igual forma en las OMVs. Además, es importante mencionar que el anticuerpo empleado fue producido en ratones inmunizados con OMVs de *K. pneumoniae*, lo cual demuestra la reacción cruzada que existe por parte de los anticuerpos generados en los modelos murinos para detectar moléculas antigénicas presentes tanto en *K. pneumoniae* como en *Leclercia adecarboxylata*, seguramente debido a la cercanía filogenética que existe entre estas dos especies. Se realizó un análisis bioinformático empleando la base de datos UniProt, la cual cuenta con un alto número de proteínas de *Leclercia adecarboxylata* (Tabla 4). Se encontraron 5 proteínas que se han reportado previamente como parte del cargo de OMVs en otras especies bacterianas. Sin embargo, la más reportada es OmpA, además de que, según la bibliografía, es de las más antigénicas, por lo que se cree, podría ser una de las proteínas expuesta en el ensayo de Western Blot.

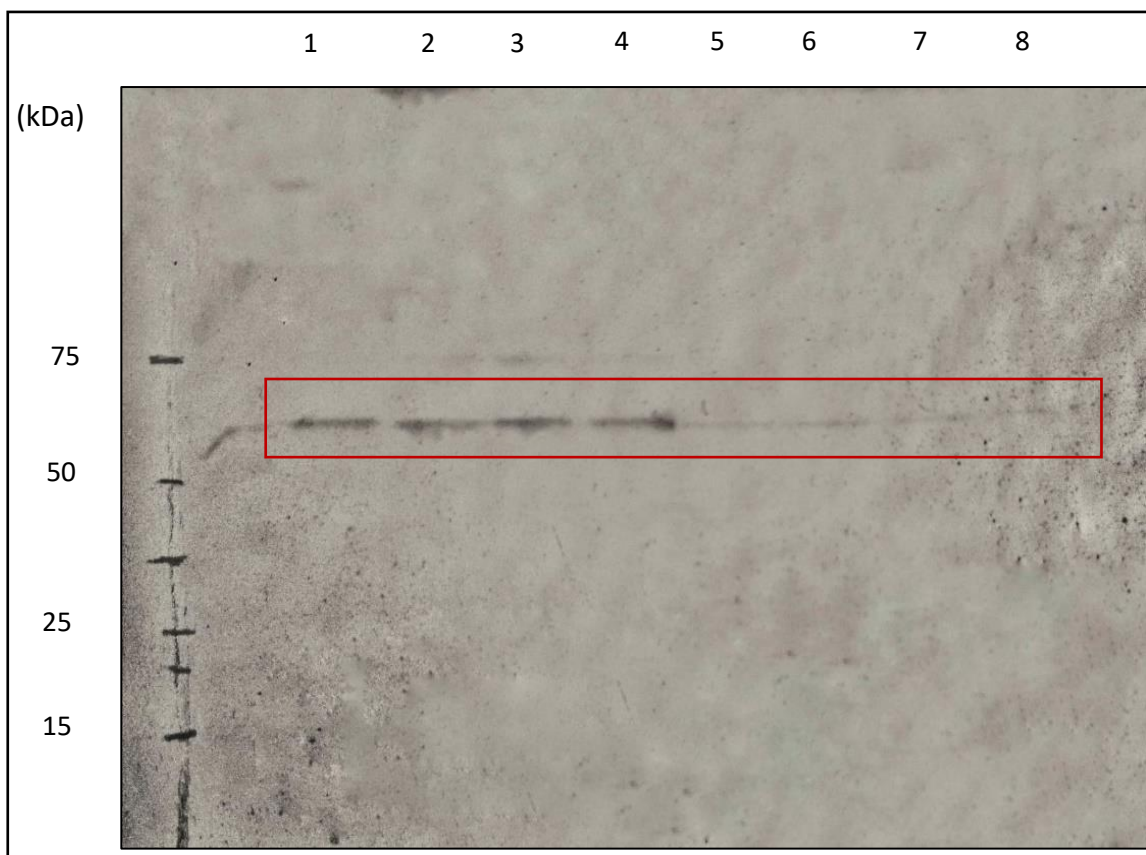


Ilustración 6. Ensayo de Western Blot. Anticuerpo primario (anticuerpos heterólogos anti-OMVs) 1:1000; Anticuerpo secundario anti IgG ratón 1:5000. Se identifican bandas inmunogénicas con peso molecular de ~65 kDa y ~60kDa. Extractos totales bacterianos: La. 008 (1), La.012 (2), La.028 (3) y La.029 (4); Extracto OMV: La. 008 (5), La.012 (6), La.028 (7) y La.029 (8).

Tabla 4. proteínas inmunogénicas candidatas presentes en extractos totales y extractos de OMV. Gracias a ensayo tipo Western Blot se proponen proteínas con peso de entre 60 y 65 kDa. Elaboración propia, resume resultados de la base de datos Uniprot.

Nombre de la proteína	Gen	Descripción	Masa	Presencia en OMVs	UniProt
Iron ABC transporter permease	<i>fbpB</i>	Asociado con la absorción de iones metálicos, como hierro, zinc y manganeso (Garmory & Titball, 2004).	65,9 kDa	(Wang <i>et al.</i> , 2019)	A0A514VFX4

Multidrug ABC transporter permease/ATP-binding protein	<i>mdlB</i>	Los transportadores de unión de ATP (ABC) resistentes a múltiples fármacos translocan estas moléculas acoplando el flujo de salida de fármaco/lípidos con energía derivada de la hidrólisis de ATP (Chang, 2003).	65,5 kDa	(Lan <i>et al.</i> , 2022)	A0A855EGT6
Ferrous iron transport protein B	<i>feoB</i>	Forma parte del sistema de transporte de hierro (II) que puede contribuir de manera importante al suministro de hierro de la célula en condiciones anaeróbicas (Kammler <i>et al.</i> , 1993)	65,7 kDa	(Lan <i>et al.</i> , 2022)	A0A4U9IXB3
Periplasmic trehalase (Alpha, alpha-trehalase) (Alpha, alpha-trehalose glucohydrolase)	<i>treA</i>	Brinda a las células la capacidad de utilizar trehalosa a alta osmolaridad al dividirla en moléculas de glucosa que	65,6 kDa	(Bosch <i>et al.</i> , 2016)	A0A514VIL6

		posteriorment e pueden ser absorbidas por el sistema de captación mediado por fosfotransfera sa (Gutierrez <i>et al.</i> , 1989).			
Outer membrane protein A family protein	<i>ompA</i>	Proteína de membrana externa. Forma complejos con RcsF, una lipoproteína expuesta en la superficie que desencadena la respuesta de estrés de Rcs cuando se produce daño en la membrana externa (Dekoninck <i>et al.</i> , 2020).	63,7 kDa	(Bielaszewsk a <i>et al.</i> , 2017; Shahryari <i>et al.</i> , 2021)	A0A5B7XS0 4

8.6 Inmunofluorescencia indirecta en OMVs.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta es una técnica la cual hace uso de moléculas fluorescentes que permiten detectar la presencia de un anticuerpo o antígeno en una muestra. En el caso de la inmunofluorescencia indirecta, los anticuerpos específicos se unen al antígeno y, en una segunda etapa, se agrega el anticuerpo secundario que se encuentra marcado con una molécula fluorescente para que se una a los anticuerpos específicos. Es decir, a diferencia de la inmunofluorescencia directa, el fluorocromo se conjuga con un anticuerpo

secundario dirigido contra el anticuerpo primario. Se decidió emplear esta técnica para poder observar la ubicación de las moléculas inmunogénicas. Las OMVs fueron tanto bloqueadas, para evitar tener un pegado inespecífico por el anticuerpo OMV, como permeabilizadas, para lograr la incorporación del anticuerpo al espacio interno, de esta manera se logró visualizar la ubicación de la molécula inmunogénica. Gracias a lo observado con el microscopio de fluorescencia, en cada una de las muestras, tanto bloqueada y permeabilizada, se pudo determinar la presencia de las moléculas inmunogénicas. Además, se logró observar que las microvesículas tienden a agruparse y forman complejos en forma de anillo (*Ilustración 7*). Por otro lado, la fluorescencia indirecta realizada a las bacterias demostró un reconocimiento alrededor de la membrana bacteriana (*Ilustración 8*).

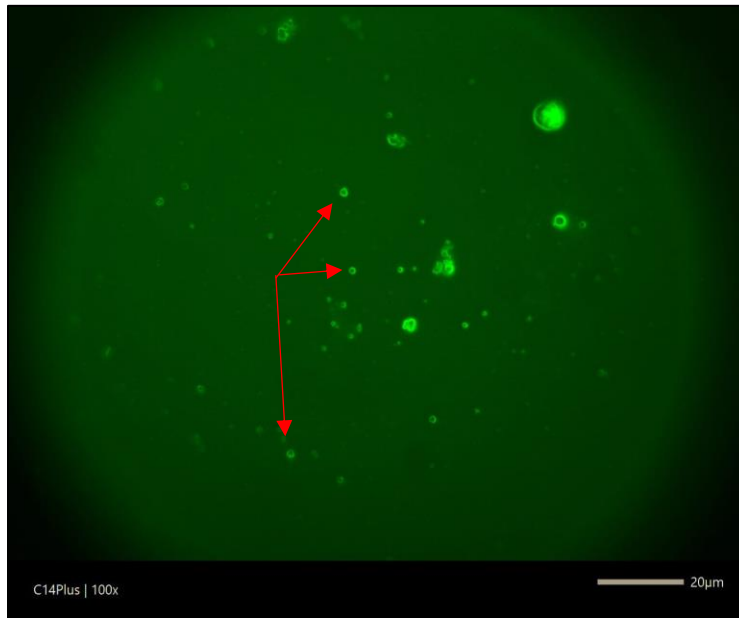


Ilustración 7. Inmunofluorescencia indirecta en OMVs. Anticuerpo primario 1:1000 (anticuerpos heterólogos anti-OMVs de Klebsiella pneumoniae); Anticuerpo secundario anti IgG acoplado a FITC 1:5000. Se aprecian estructuras en forma de anillos (indicados con flechas rojas), las cuales son agrupaciones de microvesículas en toda la muestra. Se confirma claramente la presencia de la molécula inmunogénica. Imágenes a 100x y zoom digital.



Ilustración 8. Inmunofluorescencia indirecta en bacteria, Leclercia adecarboxylata. Anticuerpo primario 1:1000 (anticuerpos heterólogos anti-OMVs de Klebsiella pneumoniae); Anticuerpo secundario anti IgG acoplado a FITC 1:5000. Se aprecia la proteína inmunogénica presente en la bacteria, además de que su localización se encuentra en la membrana. Imágenes a 100x y zoom digital.

9. Discusión

Los aislados clínicos; L.a. 008, L.a. 012, L.a. 028 y L.a. 029 de la bacteria Gramnegativa *Leclercia adecarboxylata* fueron capaces de secretar OMVs, las cuales presentaron morfología esférica y un tamaño promedio, lo que corresponde con lo citado acerca de OMVs de origen bacteriano en la bibliografía, es decir, entidades rodeadas por membranas esféricas con un tamaño entre 20 y 300 nm de diámetro, que son secretadas al medio extracelular (Beveridge, 1999). Hasta el momento, no hay reportes en la literatura sobre la capacidad de *L. adecarboxylata* de secretar OMVs, por lo tanto, no hay antecedentes sobre la morfología de estas, sin embargo, bacterias filogenéticamente cercanas han sido mayormente estudiadas, por lo cual, existen evidencias acerca de la morfología de OMVs semejante a las observadas en este trabajo. Por ejemplo, las microvesículas secretadas por *Klebsiella pneumoniae*, mediante microscopía de transmisión electrónica, fueron descritas como vesículas esféricas de tamaño generalmente

uniforme (25-250 nm) (Martora *et al.*, 2019). Desde el inicio del estudio de estas estructuras se ha mencionado la forma y tamaño característico que las identifica. Las vesículas extracelulares fueron descubiertas por Wolf en 1967, al observar su liberación por parte de células de la sangre, a estas estructuras las describió como productos o polvo resultante de la fragmentación de la membrana plaquetaria en el plasma humano (Alaarg *et al.*, 2013; Wolf, 1967). En ese mismo año, Work y colaboradores encontraron estructuras semejantes a las descritas por Wolf, entidades esféricas, pero no producidas por una célula eucariótica, sino por una bacteria, *E. coli.*, con un tamaño de entre 20 y 200 nm de diámetro (E Work *et al.*, 1966; Liang *et al.*, 2022).

Por otro lado, las OMV producidas por las cepas de *L. adecarboxylata*, presentaron un color rosado en tinción de Gram, al igual que la bacteria de origen, ya que estas estructuras se forman cuando una porción de la membrana externa (ME) se separa de la superficie bacteriana y encapsula la parte interior del espacio periplásmico (Klimentová & Stulík, 2015). La cantidad de microvesículas producida entre cada cepa fue parecida, en ninguna hubo mayor cantidad de secreción respecto a otras.

Las 4 cepas trabajadas fueron sometidas a una prueba de resistencia a antimicrobianos. El antibiograma reveló que las cepas eran resistentes a más de 6 antibióticos, como lo fueron: Amikacina, Ampicilina, Carbencilina, Cefalotina, Cefotaxima, Ciprofloxacino, Cloranfenicol, Netilmicina, Norfloxacino y Sulfametoxazol/Trimetopim; y sensibles a dos, Gentamicina y Nitrofurantoína, ambos involucrados en la inhibición de la síntesis proteica.

L. adecarboxylata se ha relacionado últimamente con la presencia de multidrogorresistencia. En 2004, Stock, Burak y Wiedemann investigaron la susceptibilidad natural de 101 cepas de *Leclercia* a 70 agentes antimicrobianos y observaron que las cepas de *L. adecarboxylata* eran naturalmente sensibles a las tetraciclinas, aminoglucósidos, casi todos los betalactámicos a excepción de dos, las quinolonas, los inhibidores de la vía del folato, el cloranfenicol, la nitrofurantoína y la azitromicina, además de que eran naturalmente resistentes a penicilina G, oxacilina, eritromicina, roxitromicina, claritromicina, cetólidos, lincosamidas,

estreptograminas, linezolid, glicopéptidos, rifampicina, ácido fusídico y fosfomicina, sin embargo, actualmente este perfil de susceptibilidad y resistencia ha cambiado, pues se han reportado casos de cepas de *Leclercia* resistentes a cefalosporinas como ceftazidima, cefepima, cefotaxima y cefoperazona; betalactámicos como aztreonam, carbapenem y piperacilina; aminoglucósidos como gentamicina y tobramicina; quinolonas y sulfonamidas. Esta resistencia se relaciona con que, gracias a estudios de secuenciación, se observó que muchas de estas cepas albergan genes productores de β -lactamasas, tales como blaTEM-1, blaCTX-M y blaNDM-1, además, integrones de clase 1, como intl1, el tipo más frecuente de integrones que se encuentran en aislados clínicos, ya que se han descrito más de 60 casetes génicos que confieren resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y trimetoprima, siendo estos elementos determinantes genéticos de la resistencia (Guzmán & Alonso, 2008; Mazzariol *et al.*, 2003; Papagiannitsis *et al.*, 2013; Piergiacomo *et al.*, 2020; Riazzi *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2012; Stock *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2019).

Gracias a la información obtenida acerca de la susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos de las diferentes cepas de *L. adecarboxylata* se realizó un segundo cultivo para sobre expresar OMVs. Para esto, el nuevo cultivo se realizó en las mismas condiciones, a excepción de que se agregó antibiótico al medio. El antibiótico empleado fue ampicilina, al cual, las 4 cepas son resistentes. De esta manera se obtuvieron niveles de expresión más altos en comparación con las obtenidas solamente por escasez de nutrientes. La morfología no se vio afectada y fue la misma entre cada una de las muestras. El estrés antibiótico parece estimular la secreción de microvesículas. Estudios posteriores a los de Work, al cual se le atribuye el descubrimiento de las OMV en los años 60s, encontraron que las microvesículas pueden ser producidas por casi todas las bacterias Gram negativas y, además, se liberan durante todas las etapas del crecimiento del cultivo bacteriano, aunque el número y su composición pueden presentar cambios ligeros según las condiciones de crecimiento. La secreción de OMVs se describe como una característica conservada en las bacterias Gram negativas, tanto patógenas como no patógenas. A lo largo del tiempo y con el incremento en el estudio de estas

entidades, los investigadores han descubierto que la biogénesis de las OMV está sumamente relacionada con varias condiciones estresantes, ya que varios reportes han demostrado que los niveles de secreción de microvesículas se ven alterados por factores estresantes tanto fisiológicos como ambientales, como las altas temperaturas, el estrés oxidativo y el tratamiento con antibióticos. El tratamiento de las bacterias con concentraciones no letales de antibióticos es un disparador ya reportado que favorece la formación de OMVs (Andreoni *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020; Kuehn & Kesty, 2005). El efecto por parte del antibiótico hacia la bacteria, que provoca la sobreexpresión de microvesículas, ha sido muy estudiado, incluso se han identificado tres vías por las cuales el estrés antibiótico estimula la formación de estas microvesículas; estrés en membrana, activación de respuesta SOS y debilitamiento de pared celular (X. Liu *et al.*, 2022; Toyofuku *et al.*, 2019). El empleo de antibióticos puede provocar el aumento de la presión sobre la membrana bacteriana. Un ejemplo de los antibióticos que pueden provocar este fenómeno, son la gentamicina y la polimixina, ya que se ha visto que promueven la formación de protuberancias en la membrana externa, lo cual desencadena la secreción de OMVs (Kadurugamuwa *et al.*, 1993). En el caso particular de la gentamicina, el cual, es un antibiótico aminoglucósido, que como ya se mencionó anteriormente, elimina a las bacterias al inhibir la síntesis de proteínas, también puede alterar el orden de empaquetamiento de los lípidos, lo que puede conducir a una inestabilidad de la membrana. En un estudio realizado por Beveridge y Kadurugamuwa en 1997, observaron que la gentamicina aumenta la liberación de OMVs de 3 a 5 veces en *P. aeruginosa* (J L Kadurugamuwa & T J Beveridge, 1997). Por otro lado, las polimixinas presentan una actividad similar a la de un detergente en la pared celular.

Anteriormente ya mencionado, el antibiótico empleado para la sobre expresión de microvesículas, fue ampicilina, el cual es un antimicrobiano betalactámico y actúa debilitando la membrana de la bacteria al presentar un efecto inhibitor de la síntesis de la pared celular. Debido a esto, se han propuesto diferentes mecanismos para la generación de OMVs, uno de ellos es, la generación de orificios en la capa de peptidoglicano a través de los cuales el material del espacio periplásmico puede sobresalir hacia el espacio extracelular y liberarse como OMV; también puede

deberse a que gracias a la interrupción de la síntesis de la membrana ocurra un fenómeno de intercalación de moléculas hidrofóbicas en la membrana externa. De forma general, se puede deber a la remodelación de la membrana, la presión de turgencia alterada del espacio periplásmico, la repulsión de carga aniónica entre las moléculas de LPS y la pérdida de enlace entre el peptidoglicano y la membrana externa (Sutterlin *et al.*, 2016; Toyofuku *et al.*, 2019). En la literatura se ha reportado que tanto la fosfomicina, como antibióticos carbapenémicos, aumentaron la producción de OMV de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) al actuar como una fuente de estrés de la envoltura bacteriana, esto, además, coincide con informes que mencionan la inducción de microvesículas mediada por imipenem y meropenem en *Stenotrophomonas maltophilia* y *P. aeruginosa*, respectivamente (Bauwens *et al.*, 2017; Devos *et al.*, 2015; X. Liu *et al.*, 2022; Siqueira *et al.*, 2014).

Gracias a la técnica de SDS-PAGE, se pudo comparar los perfiles proteicos tanto de OMVs de *L. adecarboxylata* como de la bacteria. No se encontraron bandas diferenciales entre los extractos totales de las 4 cepas trabajadas. Lo cual nos indica que las cepas no son tan diferentes entre sí a nivel de expresión de proteínas. De igual manera, entre los extractos de OMVs no se encontraron bandas diferenciales entre sí, sin embargo, entre extractos totales bacterianos y extractos de microvesículas, si se logran identificar bandas diferenciales, esto es relevante ya que se relaciona a un proceso regulado en lugar de uno al azar, por consiguiente, se puede determinar que el cargo está bien definido por la bacteria. Con el paso del tiempo y por el incremento de investigaciones sobre este tema, la biogénesis de las OMV ahora se considera un proceso fundamental, bien regulado y tal vez conservado (X. Liu *et al.*, 2022). De acuerdo a varios estudios, ciertas moléculas como proteínas y lípidos, están enriquecidos en las OMV mientras que otros están excluidos (Bauman & Kuehn, 2006; Kato *et al.*, 2002). Se ha hecho hincapié en que se debe tener en cuenta que las OMV liberadas por una sola cepa bacteriana pueden tener un contenido heterogéneo debido a múltiples mecanismos de biogénesis, sin embargo, en este trabajo se compararon perfiles proteicos de OMVs de diferentes cepas de *L. adecarboxylata*. Este cargo consistente entre OMVs, respalda un mecanismo de biogénesis de microvesículas específico y no aleatorio.

Como se ha mencionado a lo largo de este texto, las OMVs están enriquecidas en proteínas de la membrana externa, muestran composiciones de lípidos específicas y difieren en la cantidad y el contenido de las moléculas del cargo según las condiciones de crecimiento (Kulp *et al.*, 2015; Orench-Rivera & Kuehn, 2016). Además de contener proteínas, también hay reportes que indican la presencia de otras moléculas tales como fosfolípidos, peptidoglicanos, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la membrana externa (PMO), proteínas (periplásmicas, citoplasmáticas y unidas a la membrana), ácidos nucleicos (ADN, ARN), metabolitos iónicos, moléculas de señalización e inmunogénicas, etc. (Altindis *et al.*, 2014; Ellis & Kuehn, 2010; Jan, 2017; Koeppen *et al.*, 2016). La composición de las microvesículas las convierte en importantes activadores de las vías de respuesta inmunitaria innata y adquirida del huésped, al presentar propiedades inmunogénicas. Además de LPS, que es una potente molécula inmunomoduladora, las vesículas contienen porinas de membrana externa y otros importantes ligandos de activación inmunitaria (Ellis & Kuehn, 2010). Gracias a que se realizaron las técnicas de Western Blot e inmunofluorescencia indirecta, se pudo demostrar en este trabajo que las microvesículas de *L. adecarboxylata* presentan propiedades inmunogénicas. Esta inmunogenicidad es producida por una molécula de entre 60 y 65 kDa, presente tanto en extractos totales como en extractos de OMV, como era de esperarse. Todos los extractos totales al igual que todos los extractos de microvesículas de todas las cepas, presentaron la misma molécula antigénica. Además, es importante recalcar que el anticuerpo utilizado para la detección es un anticuerpo heterólogo contra OMVs, producido por ratones al ser inoculados con OMVs de *K. pneumoniae*, por lo tanto, existe la presencia de proteínas en las OMVs de *L. adecarboxylata* capaces de generar una respuesta inmune, y más aún estas guardan relación filogenética con las que se encuentran en las microvesículas de *K. pneumoniae*. La capacidad de las OMV para desencadenar respuestas inmunológicas, o, dicho en otras palabras, la capacidad inmunogénica de las microvesículas ha sido muy bien estudiada. Alaniz *et al.*, demostraron que las OMVs de *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* son potentes estimuladores de la secreción de citocinas proinflamatorias y la activación de células inmunitarias, pues, activaron las células

T CD4+, lo que indica que los componentes del antígeno proteico de las vesículas fueron procesados y presentados por las células presentadoras de antígeno (Alaniz *et al.*, 2007). Durand y colaboradores, encontraron que las vesículas de membrana externa de *Neisseria*, activan la expresión de MHC-II en células dendríticas (Durand *et al.*, 2009). Las porinas presentes, de manera prominente, en OMVs de *H. pylori*, *Salmonella*, *Fusobacterium* y especies de *Yersinia* promueven actividades proinflamatorias (Galdiero *et al.*, 1993; Takada *et al.*, 1988; Tufano *et al.*, 1994). La adhesina, NadA, presente en OMVs de *N. meningitidis*, activó por completo la producción de citoquinas de macrófagos cuando se presentó como parte del cargo de la membrana de la microvesícula, en lugar de como una mezcla de componentes de vesícula purificados (Ellis & Kuehn, 2010; Tavano *et al.*, 2009).

No hay estudios relacionados con las proteínas inmunogénicas que presenta *L. adecarboxylata*, sin embargo, al igual que con la morfología de las OMVs, bacterias cercanas filogenéticamente han sido reportadas, como es el caso de *K. pneumoniae*, en la cual se han identificado diversas proteínas inmunogénicas como lo son, OmpA, OmpK36, FepA, OmpK17, OmpW y proteína receptora de colicina I (Kurupati *et al.*, 2006). La proteína encontrada en este trabajo por medio del ensayo de Western Blot, se presume podría ser OmpA, ya que coincide con el peso molecular reportado para esta proteína producida por *L. adecarboxylata*, que es de 63,7 kDa (UniProt entry: A0A5B7XS04). Además, en la literatura se ha reportado su presencia en OMVs, así como su alta actividad inmunogénica (Shahryari *et al.*, 2021). La proteína A de la membrana externa (OmpA) se encuentra en gran cantidad en la pared celular bacteriana, se conserva entre las *Enterobacteriaceae* y está involucrada en la virulencia y el crecimiento bacteriano (Alex Pautsch & Georg E. Schulz, 1998; Kurupati *et al.*, 2011). También se menciona que contribuye a la capacidad de las bacterias Gramnegativas para invadir células de mamíferos, pues en ratones, se inocularon cepas de *E. coli* deficientes de OmpA y se observó la atenuación de su virulencia y capacidad invasiva, así como una disminución en la resistencia a la actividad bactericida del suero (Weiser & Gotschlich, 1991). Respecto a sus propiedades inmunogénicas se ha demostrado que OmpA de diferentes especies induce respuestas humorales y citotóxicas específicas en

ausencia de adyuvante (Jeannin *et al.*, 2000; Poolman, 1996). Incluso se ha relacionado con cepas hipervesiculantes, pues se han realizado deleciones del gen que produce la proteína OmpA y se ha observado el incremento en la producción de microvesículas, sin embargo, también se ha observado que defectos en la proteína, provocan la disminución de la virulencia en cepas de *Klebsiella* (Kurupati *et al.*, 2006).

Dado la gran cantidad de moléculas, así como de su variedad, tanto los componentes de las OMVs como su misma estructura, pueden ser útiles para diferentes objetivos. Aprovechando las características fisiológicas de las microvesículas, ya se ha logrado la entrega de una serie de cargas terapéuticas (siARN, microARN y proteínas) a los tejidos (Ozpolat *et al.*, 2014; Raposo & Stoorvogel, 2013). Se ha aprovechado la bioingeniería para lograr la administración específica de agentes terapéuticos mediante el diseño de nanoportadores liposomales, en otras palabras, aprovechando la estructura de las OMV. Irene y colaboradores describen una estrategia en la que, por medio de ingeniería, emplean microvesículas combinadas con antígenos heterólogos de *Staphylococcus aureus* en ratones, con el propósito de crear una vacuna contra este microorganismo, teniendo resultados satisfactorios, pues los ratones para el final del experimento estuvieron completamente protegidos contra *S. aureus*; colaborando enormemente en el camino para el desarrollo de vacunas, así como en el combate contra este importante patógeno (Irene *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019). Actualmente, como se ha visto con la creación de vacunas de mRNA, se ha detonado la investigación y el desarrollo de métodos de creación, así como de obtención de nanoestructuras liposomales para la encapsulación de terapias como antígenos, anticuerpos, antibióticos, etc. (Ozpolat *et al.*, 2014). Incluso, ya se ha evaluado la función de transportar fármacos como agentes quimioterapéuticos, a manera de aumentar la acumulación dirigida hacia el tumor provocando una toxicidad significativamente reducida, en comparación con el uso de estos agentes de manera libre (Petros & Desimone, 2010). La facilidad en la liberación de carga terapéutica requiere la bioingeniería de nanoportadores basados en liposomas naturales, como las OMV, para lograr una mejor focalización y una mayor absorción de la terapia. Como ya se

visualizó a lo largo del texto, gracias a la naturaleza inmunogénica de estas estructuras, se pueden emplear como adyuvante e incluso como vacuna.

10. Conclusiones

1. Los aislados clínicos de *Leclercia adecarboxylata* son capaces de producir vesículas de membrana externa en condiciones *in vitro*.
2. El empleo del antibiótico ampicilina durante el cultivo, promueve la sobreproducción de OMVs bajo condiciones específicas de laboratorio.
3. El protocolo propuesto para la purificación de microvesículas de *Leclercia adecarboxylata* es eficiente.
4. La morfología de las microvesículas no se ven afectadas, aunque se cambien las condiciones de cultivo. Ambos cultivos, con antibiótico y sin antibiótico, presentaron OMVs Gram negativas con morfología esférica.
5. Las OMV presentaron en su cargo una proteína inmunogénica con peso de entre ~60 y ~65 kDa, asociada con 5 proteínas posibles, las cuales tienen registro previo de estar presentes en OMVs de diferentes especies bacterianas, de las cuales se presume podría tratarse de una proteína de membrana OmpA, ya que esta proteína es de las más inmunogénicas que se han detectado en microvesículas.
6. La proteína inmunogénica se encuentra en la membrana de la OMV.
7. No existen diferencias en los perfiles proteicos de los extractos totales de las cuatro cepas. Del mismo modo, no hay diferencias en los perfiles proteicos de los extractos de OMV de las cepas trabajadas.
8. El perfil proteico entre extractos totales y extractos de OMV de las cuatro cepas presentan diferencias en cuanto a la concentración de determinadas proteínas.
9. El cargo proteico consistente entre OMVs, respalda un mecanismo de biogénesis de microvesículas específico y no aleatorio.

11. Perspectivas

1. Secuenciar la proteína de 60-65 kD para determinar de qué proteína se trata.

2. Inocular modelos murinos previamente expuestos a OMV's de *Klebsiella pneumoniae* con *Leclercia adecarboxylata* y observar capacidad de respuesta.

12. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
AM	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
BALF	Bronchus-associated lymphoid tissue
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/Nitroazul de tetrazolio
°C	grados Celcius
CB	Carbencilina
CF	Cefalotina
CFX	Cefotaxima
CPF	Ciprofloxacino
CL	Cloranfenicol
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GE	Gentamicina
gr	gramo
h/hr	Hora/Horas
IgG	Inmunoglobulina G
IL-12/6	Interleucina 12/6

kDa	Kilodalton
L.a.	Leclercia adecarboxylata
LPS	Lipopolisacárido
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/Ionization Time of flight
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
μL	microlitro
mL	mililitro
mRNA	RNA mensajero
miRNA	Micro RNA
nm	nanómetro
NET	Netilmicina
NF	Nitrofurantoína
NOF	Norfloxacino
OM	Outer membrane
OmpA/C/F	Outer membrane protein A/C/F
Ompk 35/36	<i>Klebsiella</i> outer membrane vesicle 35/36
OMV/OMVs	Outer membrane vesicle/s
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Tween 20 - Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PNH	Proteínas nucleantes de hielo

RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STX	Sulfametoxazol / Trimetropim
TA	Temperatura ambiente
T CD4+	Células T CD4+
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	α - Tumor necrosis factor
UV	Ultravioleta
V	Volts
VME	Vesículas de membrana externa

13. Bibliografía

- Aarab, A., Saddari, A., Noussaiba, B., Ayyad, A., Messaoudi, S., Amrani, R., Benaissa, E., ben Lahlou, Y., Maleb, A., & Elouennass, M. (2021). Leclercia adecarboxylata invasive infection in a patient with Hirschsprung disease: A case report. *Annals of Medicine and Surgery*, 71(October), 102927. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102927>
- Adapa, S., Konala, V. M., Nawaz, F., Javed, T., Dhingra, H., Gutierrez, I. A., & Ramirez, M. L. (2019). Peritonitis from Leclercia adecarboxylata: An emerging pathogen. *Clinical Case Reports*, 7(4), 829–831. <https://doi.org/10.1002/ccr3.2094>
- Alaarg, A., Schiffelers, R. M., van Solinge, W. W., & van Wijk, R. (2013). Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. In *Frontiers in Physiology: Vol. 4 DEC*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00365>
- Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C., & Cookson, B. T. (2007). Membrane Vesicles Are Immunogenic Facsimiles of Salmonella typhimurium That Potently Activate Dendritic Cells, Prime B and T Cell Responses, and Stimulate Protective Immunity In Vivo . *The Journal of Immunology*, 179(11), 7692–7701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7692>
- Alex Pautsch, & Georg E. Schulz. (1998). *Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain*.
- Altindis, E., Fu, Y., & Mekalanos, J. J. (2014). Proteomic analysis of Vibrio cholerae outer membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.1403683111>
- Alvarado, J. D. R. (2005). *DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL PERIFITON DE RAICES DE Eichhornia sp, Pistia sp. y Azolla sp., EN UN HUMEDAL ARTIFICIAL DE LA UNIVERSIDAD EARTH*.
- Andreoni, F., Toyofuku, M., Menzi, C., Kalawong, R., Shambat, S. M., François, P., Zinkernagel, A. S., & Eberl, L. (2019). Antibiotics Stimulate Formation of Vesicles in Staphylococcus aureus in both Phage-Dependent and-Independent Fashions and via Different Routes. <https://doi.org/10.1128/AAC>
- Anuradha, M. (2014). Leclercia adecarboxylata isolation: Case reports and review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(12), DD03–DD04. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9763.5260>
- Aquino, R., Gonzáles, E., Samaniego, S., Rivera, J., Cedeño, V., Urbina, Y., & Diringer, B. (2017). Molecular characterization of pathogenic bacteria of the respiratory tract in Peruvian patients with cystic fibrosis. *Revista Peruana de*

Medicina Experimental y Salud Publica, 34(3), 423–435.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2529>

Band, V. I., & Weiss, D. S. (2014). Mechanisms of antimicrobial peptide resistance in gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 4(1), 18–41.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics4010018>

Bauman, S. J., & Kuehn, M. J. (2006). Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes and Infection*, 8(9–10), 2400–2408.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.05.001>

Bauwens, A., Kunsmann, L., Karch, H., Mellmann, A., & Bielaszewska, M. (2017). *Antibiotic-Mediated Modulations of Outer Membrane Vesicles in Enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 and O157:H7*.
<https://journals.asm.org/journal/aac>

Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
<https://doi.org/10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999>

Bielaszewska, M., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Jarosch, K. A., Steil, D., Zhang, W., He, X., Llobes, R., Fruth, A., Kim, K. S., Schmidt, M. A., Dobrindt, U., Mellmann, A., & Karch, H. (2017). Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathogens*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006159>

Bosch, S., de Beaupaire, L., Allard, M., Mosser, M., Heichette, C., Chrétien, D., Jegou, D., & Bach, J. M. (2016). Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36162>

Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). In *Anales de Pediatría Continuada* (Vol. 7, Issue 4, pp. 214–217). [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)

Chang, G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Letters*, 555(1), 102–105. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01085-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01085-8)

Chen, W. (2020). Host Innate Immune Responses to *Acinetobacter baumannii* Infection. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00486>

Chi, B., Qi, M., & Kuramitsu, H. K. (2003). Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Research in Microbiology*, 154(9), 637–643.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.08.001>

- Cruz, A. T., Cazacu, A. C., & Allen, C. H. (2007). *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1989–1992. <https://doi.org/10.1128/JCM.00632-07>
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), 1–32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>
- Dekoninck, K., Létouart, J., Laguri, C., Demange, P., Bevernaegie, R., Simorre, J. P., Dehu, O., Iorga, B. I., Elias, B., Cho, S. H., & Collet, J. F. (2020). Defining the function of OmpA in the Rcs stress response. *ELife*, 9, 1–47. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.60861>
- Dell'annunziata, F., Ilisso, C. P., Dell'aversana, C., Greco, G., Coppola, A., Martora, F., Piaz, F. D., Donadio, G., Falanga, A., Galdiero, M., Altucci, L., Galdiero, M., Porcelli, M., Folliero, V., & Franci, G. (2020). Outer membrane vesicles derived from *klebsiella pneumoniae* influence the mirna expression profile in human bronchial epithelial beas-2b cells. *Microorganisms*, 8(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121985>
- Devos, S., van Oudenhove, L., Stremersch, S., van Putte, W., de Rycke, R., van Driessche, G., Vitse, J., Raemdonck, K., & Devreese, B. (2015). The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00298>
- Durand, V., MacKenzie, J., de Leon, J., Mesa, C., Quesniaux, V., Montoya, M., le Bon, A., & Wong, S. Y. C. (2009). Role of lipopolysaccharide in the induction of type I interferon-dependent cross-priming and IL-10 production in mice by meningococcal outer membrane vesicles. *Vaccine*, 27(13), 1912–1922. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.109>
- E Work, K W Knox, & M Vesk. (1966). The chemistry and electron microscopy of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 133(2), 438–449.
- Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 74(1), 1092–2172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-09>
- Gajdács, M., Ábrók, M., Lázár, A., Terhes, G., & Burián, K. (2020). *Leclercia adcarboxylata* as an emerging pathogen in human infections: A 13-year retrospective analysis in Southern Hungary. *Journal of Infection in Developing Countries*, 14(9), 1004–1010. <https://doi.org/10.3855/JIDC.12598>

- Galdiero, F., Cipollaro De L'ero, G., Benedetto, N., Galdiero, M., & Tufano, M. A. (1993). Release of Cytokines Induced by Salmonella typhimurium Porins. In *INFECrION AND IMMUNITY* (Vol. 61, Issue 1).
- Garmory, H. S., & Titball, R. W. (2004). ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. In *Infection and Immunity* (Vol. 72, Issue 12, pp. 6757–6763). <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6757-6763.2004>
- Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Rodríguez-Noriega, E., González-Díaz, E., Silva-Sanchez, J., Garza-Ramos, U., Contreras-Coronado-Tovar, I. F., Santos-Hernández, J. E., Gutiérrez-Bañuelos, D., Mena-Ramírez, J. P., Ramírez-De-los-Santos, S., Camacho-Ortiz, A., & Morfín-Otero, R. (2021). Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing *Leclercia adecarboxylata*. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05923-0>
- Grande, R., di Marcantonio, M. C., Robuffo, I., Pompilio, A., Celia, C., Marzio, L. di, Paolino, D., Codagnone, M., Muraro, R., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., & Mincione, G. (2015). *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 Outer Membrane Vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01369>
- Grantham, W. J., Funk, S. S., & Schoenecker, J. G. (2015). *Leclercia adecarboxylata* Musculoskeletal Infection in an Immune Competent Pediatric Patient: An Emerging Pathogen? . *Case Reports in Orthopedics*, 2015, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2015/160473>
- Gutierrez, C., Ardourel, M., Bremer, E., Middendorf, A., Boos, W., & Ehmann, U. (1989). *Analysis and DNA sequence of the osmoregulated treA gene encoding the periplasmic trehalase of Escherichia cob" K12* (Vol. 217). Springer-Verlag.
- Guzmán, M., & Alonso, G. (2008). Integrone clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28(2), 105–109. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera (Costa Rica), M., Amuy, E., Vargas, A., & Herrera, M. L. (2000). Revista médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. In *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera* (Vol. 35, Issues 1–2). Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera.

- Hynes, S. O., Keenan, J. I., Ferris, J. A., Annuk, H., & Moran, A. P. (2005). *Lewis Epitopes on Outer Membrane Vesicles of Relevance to Helicobacter pylori Pathogenesis* (Vol. 10, Issue 2).
- Irene, C., Fantappiè, L., Caproni, E., Zerbini, F., Anesi, A., Tomasi, M., Zanella, I., Stupia, S., Prete, S., Valensin, S., König, E., Frattini, L., Gagliardi, A., Isaac, S. J., Grandi, A., Guella, G., & Grandi, G. (2019). Bacterial outer membrane vesicles engineered with lipidated antigens as a platform for *Staphylococcus aureus* vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(43), 21780–21788. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905112116>
- J L Kadurugamuwa, & T J Beveridge. (1997). Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(5), 615–621.
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>
- Jarzab, M., Posselt, G., Meisner-Kober, N., & Wessler, S. (2020). *Helicobacter pylori*-derived outer membrane vesicles (Omvs): Role in bacterial pathogenesis? In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 9, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091328>
- Jeannin, P., Renno, T., Goetsch, L., Miconnet, I., Aubry, J.-P., Delneste, Y., Herbault, N., Baussant, T., Magistrelli, G., Soulas, C., Romero, P., Cerottini, J.-C., & Bonnefoy, J.-Y. (2000). *OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway*. <http://immunol.nature.com>
- Kadurugamuwa, J. L., Clarke, A. J., & Beveridge, T. J. (1993). Surface Action of Gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 175, Issue 18). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Kammler, M., Schon, C., & Hantke, K. (1993). Characterization of the Ferrous Iron Uptake System of *Escherichia coli*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 175, Issue 19). <http://jb.asm.org/>
- Kato, S., Kowashi, Y., & Demuth, D. R. (2002). Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microbial Pathogenesis*, 32(1), 1–13. <https://doi.org/10.1006/mpat.2001.0474>
- Kim, S. W., Seo, J. S., Park, S. bin, Lee, A. R., Lee, J. S., Jung, J. W., Chun, J. H., Lazarte, J. M. S., Kim, J., Kim, J. H., Song, J. W., Franco, C., Zhang, W., Ha, M. W., Paek, S. M., Jung, M., & Jung, T. S. (2020). Significant increase in the

secretion of extracellular vesicles and antibiotics resistance from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by ampicillin stress. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78121-8>

Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. In *Microbiological Research* (Vol. 170, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>

Koeppen, K., Hampton, T. H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S. A., Mielcarz, D. W., Demers, E. G., Dolben, E. L., Hammond, J. H., Hogan, D. A., & Stanton, B. A. (2016). A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathogens*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>

Kolling, G. L., Matthews, K. R., & Rd, D. (1999). Export of Virulence Genes and Shiga Toxin by Membrane Vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 65, Issue 5).

Kuehn, M. J., & Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. In *Genes and Development* (Vol. 19, Issue 22, pp. 2645–2655). <https://doi.org/10.1101/gad.1299905>

Kulp, A. J., Sun, B., Ai, T., Manning, A. J., Orench-Rivera, N., Schmid, A. K., & Kuehn, M. J. (2015). Genome-wide assessment of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139200>

Kurupati, P., Ramachandran, N. P., & Poh, C. L. (2011). Protective efficacy of DNA vaccines encoding outer membrane protein A and OmpK36 of *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(1), 82–88. <https://doi.org/10.1128/CVI.00275-10>

Kurupati, P., Teh, B. K., Kumarasinghe, G., & Poh, C. L. (2006). Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis. *Proteomics*, 6(3), 836–844. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500214>

Lan, Y., Zhou, M., Li, X., Liu, X., Li, J., & Liu, W. (2022). Preliminary Investigation of Iron Acquisition in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Mediated by Outer Membrane Vesicles. *Infection and Drug Resistance*, 15, 311–320. <https://doi.org/10.2147/IDR.S342368>

Lee, W. H., Choi, H. il, Hong, S. W., Kim, K. S., Gho, Y. S., & Jeon, S. G. (2015). Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(9). <https://doi.org/10.1038/emm.2015.59>

- Lei, Y., Zhao, F., Shao, J., Li, Y., Li, S., Chang, H., & Zhang, Y. (2019). Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. *PeerJ*, 2019(1), 1–48. <https://doi.org/10.7717/peerj.6185>
- Li, J., Park, A., Fulmer, B. R., & Garg, T. (2021). *Leclercia adecarboxylata* urinary tract infection in a patient with bladder cancer and recurrent hematuria. *Urology Case Reports*, 36, 101579. <https://doi.org/10.1016/j.eucr.2021.101579>
- Li, Z., Clarke, A. J., & Beveridge, T. J. (1998). Gram-Negative Bacteria Produce Membrane Vesicles Which Are Capable of Killing Other Bacteria. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 180, Issue 20).
- Liang, X., Dai, N., Sheng, K., Lu, H., Wang, J., Chen, L., & Wang, Y. (2022). Gut bacterial extracellular vesicles: important players in regulating intestinal microenvironment. *Gut Microbes*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2134689>
- Liu, X., Xiao, J., Wang, S., Zhou, J., Qin, J., Jia, Z., Wang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., & Hao, H. (2022). Research Progress on Bacterial Membrane Vesicles and Antibiotic Resistance. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231911553>
- Liu, Z., & Xu, W. (2022). Neutrophil and Macrophage Response in *Acinetobacter Baumannii* Infection and Their Relationship to Lung Injury. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.890511>
- Lucía Correa, A., María Mazo, L., Patricia Valderrama, M., Restrepo, A., & Jaimes, F. (2012). Descripción de un brote de bacteriemia por *Leclercia adecarboxylata* probablemente asociado al uso de viales contaminados de heparina. *Infectio*, 16(2), 117–121. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(12\)70065-6](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(12)70065-6)
- Macedo-Raygoza, G. M., Valdez-Salas, B., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., Canto-Canché, B. B., Carrillo-Beltrán, M., di Mascio, P., White, J. F., & Beltrán-García, M. J. (2019). *Enterobacter cloacae*, an Endophyte That Establishes a Nutrient-Transfer Symbiosis With Banana Plants and Protects Against the Black Sigatoka Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 10(3), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00804>
- Marion, C. R., Lee, J., Sharma, L., Park, K.-S., Lee, C., Liu, W., Liu, P., Feng, J., Gho, Y. S., & dela Cruz, C. S. (2019). *Toll-Like Receptors 2 and 4 Modulate Pulmonary Inflammation and Host Factors Mediated by Outer Membrane Vesicles Derived from Acinetobacter baumannii*. <https://doi.org/10.1128/IAI>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>

- Martora, F., Pinto, F., Folliero, V., Cammarota, M., Dell'Annunziata, F., Squillaci, G., Galdiero, M., Morana, A., Schiraldi, C., Giovane, A., Galdiero, M., & Franci, G. (2019). Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103719>
- Mazzariol, A., Zuliani, J., Fontana, R., & Cornaglia, G. (2003). Isolation from blood culture of a *Leclercia adecarboxylata* strain producing an SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1738–1739. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1738-1739.2003>
- Merza, N., Lung, J., Taha, A., Qasim, A., Frost, J., & Naguib, T. (2019). *Leclercia adecarboxylata* Cholecystitis with Septic Shock in Immunocompetent Patient . *Case Reports in Critical Care*, 2019, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2019/5057071>
- Nadarasah, G., & Stavrinides, J. (2014). Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 3), 602–615. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073452-0>
- Ordóñez-gutiérrez, E. A. (2011). *Artículo original Sepsis nosocomial por*. 32(5), 273–276.
- Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2016). Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. In *Cellular Microbiology* (Vol. 18, Issue 11, pp. 1525–1536). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cmi.12676>
- Ozpolat, B., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2014). Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.008>
- Papagiannitsis, C. C., Študentová, V., Hrabák, J., Kubele, J., Jindrák, V., & Žemlicková, H. (2013). Isolation from a nonclinical sample of *Leclercia adecarboxylata* producing a VIM-1 metallo- β -lactamase. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 57, Issue 6, pp. 2896–2897). <https://doi.org/10.1128/AAC.00052-13>
- Pérez-Moreno, M. O., Anguera, J., Carulla, M., & Pérez-Moreno, M. (2003). Artritis séptica por *Leclercia adecarboxylata* de origen probablemente yatrogénico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(3), 167–168. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72909-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72909-7)
- Petros, R. A., & Desimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>

- Pettit, R. K., & Judd, R. C. (1992). The interaction of naturally elaborated blebs from serum-susceptible and serum-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* with normal human serum. In *Molecular Microbiology* (Vol. 6, Issue 6).
- Piergiacomo, F., Borruso, L., Ciccazzo, S., Rizzi, S., Zerbe, S., & Brusetti, L. (2020). Environmental distribution of AR class 1 integrons in upper adige river catchment (Northern Italy). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph17072336>
- Pires, S., & Parker, D. (2019). Innate Immune Responses to *Acinetobacter baumannii* in the Airway. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 39(8), 441–449. <https://doi.org/10.1089/jir.2019.0008>
- Poolman, J. T. (1996). *BACTERIAL OUTER MEMBRANE PROTEIN VACCINES The Meningococcal Example*.
- Prakash, M. R., Ravikumar, R., Patra, N., & Indiradevi, B. (2015). Hospital-acquired pneumonia due to *Leclercia adecarboxylata* in a neurosurgical centre. *Journal of Postgraduate Medicine*, 61(2), 123–125. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.153108>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Riazzo, C., López-Cerero, L., Rojo-Martín, M. D., Hoyos-Mallecot, Y., Fernández-Cuenca, F., Martín-Ruíz, J. L., Pascual-Hernández, Á., Naas, T., & Navarro-Marí, J. M. (2017). First report of NDM-1-producing clinical isolate of *Leclercia adecarboxylata* in Spain. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(3), 268–270. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.013>
- Ronci, M., del Prete, S., Puca, V., Carradori, S., Carginale, V., Muraro, R., Mincione, G., Aceto, A., Sisto, F., Supuran, C. T., Grande, R., & Capasso, C. (2019). Identification and characterization of the α -CA in the outer membrane vesicles produced by *Helicobacter pylori*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 189–195. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1539716>
- Rosen, G., Naor, R., Rahamim, E., Yishai, R., & Sela, M. N. (1995). Proteases of *Treponema denticola* Outer Sheath and Extracellular Vesicles. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 63, Issue 10).
- Sánchez-Códez, M., Lubián-Gutiérrez, M., Blanca-García, J. A., & Aragón, C. P. (2019). *Leclercia adecarboxylata* and *Raoultella ornithinolytica* catheter-related infection in a child with mitochondrial disease. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 117(2), E147–E149. <https://doi.org/10.5546/AAP.2019.E147>

- Sandeep Thirunavukkarasu, Veena Ramaswamy, V. R. (2014). *Leclercia adecarboxylata* in Para-ovarian abscess. In *Leclercia adecarboxylata in Para-ovarian abscess* (pp. 22–23). J Acad Clin Microbiol. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-60984-5.00062-7>
- Schaumann, R., Knoop, N., Genzel, G. H., Losensky, K., Rosenkranz, C., Stîngu, C. S., Schellenberger, W., Rodloff, A. C., & Eschrich, K. (2013). Discrimination of Enterobacteriaceae and Non-fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *The Open Microbiology Journal*, 7(1), 118–122. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010118>
- Schlichting, E., Lyberg, T., Solberg, O., Marit Andersen, R., & Schlichting, E. (1993). Endotoxin Liberation from *Neisseria meningitidis* Correlates to their Ability to Induce Procoagulant and Fibrinolytic Factors in Human Monocytes. In *Scand J Infect Dis* (Vol. 25).
- Schooling, S. R., & Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 5945–5957. <https://doi.org/10.1128/JB.00257-06>
- Shahryari, S., Talaei, M., Haghbeen, K., Adrian, L., Vali, H., Shahbani Zahiri, H., & Noghabi, K. A. (2021). New Provisional Function of OmpA from *Acinetobacter* sp. Strain SA01 Based on Environmental Challenges . *MSystems*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.01175-20>
- Shin, G. W., You, M. J., Lee, H. S., & Lee, C. S. (2012). Catheter-related bacteremia caused by multidrug-resistant *Leclercia adecarboxylata* in a patient with breast cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 3129–3132. <https://doi.org/10.1128/JCM.00948-12>
- Siqueira, V. L. D., Cardoso, R. F., Caleffi-Ferracioli, K. R., de Lima Scodro, R. B., Fernandez, M. A., Fiorini, A., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2014). Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3957–3967. <https://doi.org/10.1128/AAC.02584-13>
- Spiegelhauer, M. R., Andersen, P. F., Frandsen, T. H., Nordestgaard, R. L. M., & Andersen, L. P. (2019). *Leclercia adecarboxylata*: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. *Infectious Diseases*, 51(3), 179–188. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1536830>
- Stock, I., Burak, S., & Wiedemann, B. (2004). Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(8), 724–733. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00892.x>

- Sun, Q., Wang, H., Shu, L., Dong, N., Yang, F., Zhou, H., Chen, S., & Zhang, R. (2019). *Leclercia adecarboxylata* From Human Gut Flora Carries mcr-4.3 and blaIMP-4-Bearing Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 10(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02805>
- Sutterlin, H. A., Shi, H., May, K. L., Miguel, A., Khare, S., Huang, K. C., & Silhavy, T. J. (2016). Disruption of lipid homeostasis in the Gram-negative cell envelope activates a novel cell death pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), E1565–E1574. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601375113>
- Takada, H., Ogawa, T., Yoshimura, F., Otsuka, K., Kokeguchi, S., Kato, K., Umemoto, T., & Kotani, S. (1988). Immunobiological Activities of a Porin Fraction Isolated from *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 56, Issue 4).
- Tavano, R., Franzoso, S., Cecchini, P., Cartocci, E., Oriente, F., Aricò, B., & Papini, E. (2009). The membrane expression of *Neisseria meningitidis* adhesin A (NadA) increases the proimmune effects of MenB OMVs on human macrophages, compared with NadA - OMVs, without further stimulating their proinflammatory activity on circulating monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(1), 143–153. <https://doi.org/10.1189/jlb.0109030>
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 13–24). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Tufano, M. A., Rossano, F., Catalanotti, P., Liguori, G., Capasso, Maria, C., Ceccarelli, T., & Marinelli, P. (1994). Immunobiological Activities of *Helicobacter pylori* Porins Among the mediators most involved in inflammation and. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 62, Issue 4).
- Turner, K. L., Cahill, B. K., Dilello, S. K., Gutel, D., Brunson, D. N., Albertí, S., & Ellis, T. N. (2016). Porin loss impacts the host inflammatory response to outer membrane vesicles of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1360–1369. <https://doi.org/10.1128/AAC.01627-15>
- Wang, J., Wang, Y., Tang, L., & Garcia, R. C. (2019). Extracellular vesicles in mycobacterial infections: Their potential as molecule transfer vectors. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01929>
- Waskito, L. A., Salama, N. R., & Yamaoka, Y. (2018). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. In *Helicobacter* (Vol. 23). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/hel.12516>

- Weiser, J. N., & Gotschlich, E. C. (1991). Outer Membrane Protein A (OmpA) Contributes to Serum Resistance and Pathogenicity of Escherichia coli K-1. In *INFECTION AND IMMUNITY*.
- Wolf, P. (1967). *The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma*.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Hanawa, T., & Kamiya, S. (2009). Outer membrane vesicles of helicobacter pylori TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-197>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Woo, T., Kurata, S., Zaman, C., Hojo, F., Hanawa, T., Kato, S., & Kamiya, S. (2011). Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of Helicobacter pylori. *Anaerobe*, 17(6), 388–390. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.020>
- Zlatkov, N., Nadeem, A., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2021). Eco-evolutionary feedbacks mediated by bacterial membrane vesicles. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(2), 1–26. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa047>