



---

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización parcial de microvesículas de membrana  
externa (OMV's) de *Citrobacter* spp: transferencia  
horizontal e inmunogenicidad

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:  
C. MARÍA GUIROLA BENÍTEZ

DIRECTORA DE TESIS:  
D.C. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ



## Agradecimientos personales y académicos

A mi familia, especialmente a mi mamá y a mi hermana, por amarme, acompañarme y jamás dejarme desistir. Porque mi mayor motivación siempre ha sido y será hacerlas sentir orgullosas y agradecer sus sacrificios; las amo infinitamente.

A la Dra. Norma Rojas por ser literalmente la primera persona que me permitió trabajar en su laboratorio (402 de Microbiología Industrial). Apenas regresábamos de la pandemia y, honestamente, sin ninguna habilidad práctica me dio mis primeros colegas de trabajo, primeras lecciones y oportunidades en todo sentido y quizás sin saberlo, con su tutela y atención abrió todo un mundo para mí.

Le agradezco a la Dra. Cristina González y al Dr. Alejandro Carabarin por dejarme estar en su equipo, por su guía, su paciencia y su apoyo en los días hábiles e inhábiles en que me presentaba a trabajar, por explicar todo con una sonrisa y reconfortarme siempre que lo necesité. Pero, sobre todo, por dejarme investigar en un ámbito que me fascinaba y durante mucho tiempo solo vi de lejos. Los admiro.

A Cardoso, Bonilla, Ale, Darinkha, Sofis, Gaby, Joh y Pau, porque desde que nuestras vidas se cruzaron las horas en el laboratorio se pasaron volando, porque su propia experiencia y dedicación en sus respectivas investigaciones siempre han estado a mi lado para guiarme. Por darme sonrisas, por darme consejos, por darme descansos fantásticos y de los mejores días de mi vida como universitaria.

A Javier, por ser mi fan, mi staff, mi compañero en este camino y respaldarme sin dudar aunque no siempre entendiera lo que pasaba por mi cabeza, por alentarme a soñar y por no hacerme sentir nunca que algo es muy grande para mí. Todo es mutuo y de todo corazón.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser mi *alma mater*, brindarme años llenos de conocimiento y experiencia que me fortalecieron de manera personal, académica y profesional.

Finalmente, a todas las personas que, directa o indirectamente, aportaron su granito de arena para la culminación de este proyecto, por confiar en mí, por invitarme a eventos, por mirarme con ojitos de fascinación, por acompañarme y hacerme mil preguntas curiosas que fueron fuente de motivación constante. Gracias Vale.

La ciencia es el don de imaginar  
con los ojos abiertos.

## Contenido

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Agradecimientos personales y académicos.....                                                                                           | 1  |
| Contenido.....                                                                                                                         | 3  |
| Índice de tablas.....                                                                                                                  | 5  |
| Índice de figuras.....                                                                                                                 | 5  |
| Resumen.....                                                                                                                           | 7  |
| 1. Introducción.....                                                                                                                   | 8  |
| 1.2. Enterobacterias.....                                                                                                              | 8  |
| 1.3. <i>Citrobacter</i> spp.....                                                                                                       | 8  |
| 1.3.1. Importancia clínica de <i>C. freundii</i> y <i>C. amalonaticus</i> .....                                                        | 10 |
| 1.4. Resistencia a antibióticos.....                                                                                                   | 10 |
| 1.4.1. Mecanismos de resistencia antibiótica en <i>Citrobacter</i> spp.....                                                            | 11 |
| 1.5. Vesículas de membrana externa (OMV's ).....                                                                                       | 14 |
| 1.5.1. Transferencia horizontal de genes.....                                                                                          | 16 |
| 1.5.2. Respuesta inmune por OMV's.....                                                                                                 | 17 |
| 1.6. Modelo experimental.....                                                                                                          | 18 |
| 2. Antecedentes.....                                                                                                                   | 18 |
| 2.1. Antecedentes generales.....                                                                                                       | 18 |
| 2.2. Antecedentes particulares.....                                                                                                    | 19 |
| 3. Justificación.....                                                                                                                  | 20 |
| 4. Hipótesis.....                                                                                                                      | 21 |
| 5. Objetivos.....                                                                                                                      | 21 |
| 5.1. Objetivo general.....                                                                                                             | 21 |
| 5.2. Objetivos específicos.....                                                                                                        | 21 |
| 6. Materiales y métodos.....                                                                                                           | 23 |
| 6.1. Esquema general de trabajo.....                                                                                                   | 23 |
| 6.2. Resembrado de las cepas de <i>C. freundii</i> y <i>C. amalonaticus</i> .....                                                      | 24 |
| 6.3. Secreción de OMV's en medio con estrés.....                                                                                       | 24 |
| 6.4. Purificación de OMV's por centrifugación diferencial y filtración.....                                                            | 24 |
| 6.5. Tinción de Gram para OMV's.....                                                                                                   | 25 |
| 6.6. Cuantificación de OMV's por método de Bradford.....                                                                               | 25 |
| 6.7. Obtención de sueros inmunes y esquema de inmunización en modelo murino BALB/c.....                                                | 26 |
| 6.8. Título de anticuerpos.....                                                                                                        | 27 |
| 6.9. Isotipificación de anticuerpos usando KIT ISO2 de Sigma.....                                                                      | 27 |
| 6.9.1. Análisis estadístico.....                                                                                                       | 28 |
| 6.10. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta IFI.....                                                                                 | 29 |
| 6.11. Inmunomarcaje con anticuerpo acoplado a fosfatasa.....                                                                           | 30 |
| 6.12. Obtención del perfil proteico de extractos totales de <i>C. freundii</i> , <i>C. amalonaticus</i> y de las OMV's secretadas..... | 30 |
| 6.13. Electroforesis SDS-PAGE.....                                                                                                     | 31 |
| 6.14. Western blot. Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa.....                                                              | 31 |
| 6.15. Ensayo de protección a cepa susceptible a antibióticos y transferencia genética.....                                             | 32 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.16. Antibiógramas de <i>Citrobacter</i> spp. y <i>E. coli</i> transformada por microvesículas. | 34 |
| 7. Resultados.....                                                                               | 34 |
| 7.1. Identificación de OMV's por tinción de Gram modificada.....                                 | 34 |
| 7.2. Cuantificación de OMV's y perfiles proteicos bacterianos.....                               | 37 |
| 7.3. Respuesta inmune generada en biomodelo BALB/c.....                                          | 37 |
| 7.4. Isotipificación de anti-OMV's totales.....                                                  | 39 |
| 7.5. Especificidad de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta.....                    | 41 |
| 7.6. Especificidad de anticuerpos mediante inmunomarcaje con fosfatasa alcalina..                | 43 |
| 7.7. SDS-PAGE. Perfiles proteicos de extractos bacterianos y extractos de OMV's...               | 44 |
| 7.8. Identificación de proteínas potencialmente inmunogénicos mediante Western blot.....         | 45 |
| 7.9. Ensayo de protección y transferencia genética a cepa susceptible a AM.....                  | 46 |
| 7.10. Prueba de susceptibilidad a antibióticos por sensidiscos (antibiógramas)...                | 48 |
| 8. Discusión.....                                                                                | 49 |
| 9. Conclusiones.....                                                                             | 57 |
| 10. Perspectivas / líneas de trabajo a futuro.....                                               | 57 |
| 11. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos.....                                            | 58 |
| 12. Bibliografía.....                                                                            | 59 |
| 13. Anexos.....                                                                                  | 69 |

## Índice de tablas

| Tabla | Título                                                                                                                                                                                 | Página |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1     | <i>Resultados de las evaluaciones de Citrobacter spp. mediante Análisis de Decisiones con Criterios Múltiples (MCDA) presentado en la lista de patógenos bacterianos prioritarios.</i> | 9      |
| 2     | <i>Principales mecanismos de resistencia reportados en Citrobacter spp.</i>                                                                                                            | 11     |
| 3     | <i>Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para E. coli DH5α en contacto con OMV's de C. amalonaticus.</i>                                                   | 33     |
| 4     | <i>Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para E. coli DH5α en contacto con OMV's de C. freundii.</i>                                                       | 33     |
| 5     | <i>ANOVA de tres vías: inmunogeno, especie, inmunoglobulina.</i>                                                                                                                       | 40     |
| 6     | <i>Probable perfil proteico de Citrobacter spp. y sus OMV's en función de su peso molecular.</i>                                                                                       | 45     |
| 7     | <i>Perfil de resistencia de Citrobacter spp. y E. coli transformada mediante OMV's utilizando sensidiscos.</i>                                                                         | 48     |

## Índice de figuras

| Figura | Título                                                                                                                         | Página |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | <i>Mecanismos de biogénesis de las OMV's.</i>                                                                                  | 14     |
| 2      | <i>Funciones de las microvesículas de membrana externa (OMV's).</i>                                                            | 15     |
| 3      | <i>Mecanismos de transferencia horizontal de genes.</i>                                                                        | 16     |
| 4      | <i>Diseño experimental.</i>                                                                                                    | 23     |
| 5      | <i>Esquema de inmunización en modelo murino BALB/c para producción de anticuerpos policlonales anti-OMV's.</i>                 | 26     |
| 6      | <i>Representación de ensayo de isotipificación de anticuerpos.</i>                                                             | 27     |
| 7      | <i>Representación, ensayo de inmunofluorescencia indirecta con OMV's y células de Citrobacter spp.</i>                         | 29     |
| 8      | <i>Esquema del ensayo de protección a cepa susceptible a ampicilina y transferencia genética.</i>                              | 32     |
| 9      | <i>Tinción de Gram convencional del preinóculo de Citrobacter spp.</i>                                                         | 35     |
| 10     | <i>Tinción de Gram modificada para OMV's de cultivos de Citrobacter spp.</i>                                                   | 36     |
| 11     | <i>Tinción de Gram modificada de OMV's purificadas.</i>                                                                        | 37     |
| 12     | <i>Títulos de anticuerpos Anti-OMV's de Citrobacter spp. generados durante el esquema de inmunización en el modelo murino.</i> | 38     |
| 13     | <i>Isotipificación de los anticuerpos obtenidos en el suero hiperinmune</i>                                                    | 40     |

|           |                                                                                                                                       |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|           | <i>con diferentes antígenos de unión.</i>                                                                                             |    |
| <b>14</b> | <i>Ensayo de inmunofluorescencia indirecta de Citrobacter spp. y sus OMV's.</i>                                                       | 42 |
| <b>15</b> | <i>Inmunomarcaje de Citrobacter spp. y sus OMV's con anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.</i>                                    | 43 |
| <b>16</b> | <i>Migración electroforética de las proteínas bacterianas y OMV's (SDS-PAGE).</i>                                                     | 44 |
| <b>17</b> | <i>Western blot de los extractos totales bacterianos y OMV's.</i>                                                                     | 46 |
| <b>18</b> | <i>Ensayo de protección a AM y transferencia genética en E. coli DH5-α por OMV's.</i>                                                 | 47 |
| <b>19</b> | <i>Componentes inmunogénicos de las OMV's y su interacción con los receptores tipo Toll.</i>                                          | 51 |
| <b>20</b> | <i>Funciones fisiológicas y patológicas propuestas de las principales proteínas de membrana en OMV's de bacterias Gram negativas.</i> | 54 |
| <b>21</b> | <i>Protección a antibióticos medidas por OMV's.</i>                                                                                   | 55 |

## Resumen

*Citrobacter* spp., es un género de bacterias Gram-negativas que incluye patógenos oportunistas multirresistentes, principalmente a carbapenémicos, betalactámicos y aminoglucósidos, por lo que ha sido clasificado en la posición 16 de la WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024. Además, estima que en 2050 las muertes ocasionadas por bacterias resistentes a antibióticos podrían superar las cifras anuales por cáncer.

Aunado a los mecanismos de resistencia convencionales, *Citrobacter* spp., tiene la capacidad de secretar microvesículas de membrana externa (OMV's). Estas son estructuras esféricas con un tamaño entre 20 a 250 nm, y un cargo asociado a proteínas, DNA, y otros factores bioactivos, que cumplen un importante papel en el *quorum sensing*, la modulación del sistema inmune y la transferencia horizontal de genes de resistencia (por sus siglas, HGT).

Durante la biogénesis de las OMV's, estas incorporan componentes celulares y de membrana, por lo que se comparó su perfil proteico con el extracto total bacteriano mediante SDS-PAGE, se identificaron proteínas de membrana externa mediante Western Blot y se caracterizó la respuesta inmune del modelo murino inmunizado por vía intraperitoneal con vesículas purificadas de *C. freundii* y *C. amalonaticus*.

Posteriormente, utilizando los anticuerpos policlonales anti-OMV's obtenidos, se realizaron inmunomarcajes, con FITC y fosfatasa, que mostraron afinidad a las estructuras celulares y microvesículas, además, mediante ensayos de ELISA se demostró la inducción de una respuesta Th1 predominante frente a OMV's y extractos proteicos bacteriano, alcanzando un título de 1:6400 en ambas especies.

Por otra parte, las OMV's mostraron un efecto protector y de HGT a *E. coli* DH5α en un medio adicionado con ampicilina. Las cepas transformadas mostraron un fenotipo de resistencia adquirida a antibióticos como betalactámicos, tetraciclina, cloranfenicol y nitrofuranos.

**Palabras clave:** OMV's, *Citrobacter*, anticuerpos policlonales, respuesta inmune, resistencia a antibióticos, transferencia horizontal de genes.

## 1. Introducción

### 1.2. Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae*, también conocida como enterobacterias, está constituida por células Gram-negativas no formadoras de esporas, anaerobio facultativas, capaces de fermentar glucosa y reducir nitratos a nitritos. La mayoría presenta una morfología bacilar con un diámetro de 0.3 a 1.5 micrómetros (Brenner & Farmer, 2015; Willey et al., 2008).

Actualmente esta familia incluye 68 géneros entre los que destacan patógenos de gran importancia clínica como ***Citrobacter***, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* y *Yersinia*, sumando un total de 355 especies (Janda & Abbott, 2021).

La alta prevalencia de enterobacterias multidrogorresistentes en el mundo es alarmante. Según los resultados de un estudio sistemático sobre los reportes de 2013 a 2023 en África, Asia, Europa y Sudamérica, las infecciones provocadas por bacterias resistentes a carbapenémicos, ya sea mediante genes codificantes para carbapenemasas o bombas de eflujo, presentaron una prevalencia del 43.06% (Tuhamize & Bazira, 2024). Mientras que en EE.UU y Europa, se reportó que el 17.5% de los aislamientos clínicos de enterobacteriales obtenidos entre 2016 y 2018, no fueron susceptibles al tratamiento con cefalosporinas (Belley et al., 2021). Como resultado, la Organización Mundial de la Salud clasificó a las enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos como grupo crítico, y particularmente a las especies de *Citrobacter* en la posición 16 en su Lista de Patógenos Prioritarios, actualizada en 2024.

### 1.3. *Citrobacter* spp.

Se ha reportado la presencia de bacterias del género *Citrobacter* en el tracto urinario, respiratorio, hígado, intestinos, meninges, torrente sanguíneo y heridas en el ser humano (Pepperell et al., 2002 ; Ramsamy et al., 2020 ; Liu et al., 2021 ; Chenhaka et al., 2023), así como en cuerpos de agua, suelo y alimentos (Arens & Verbist, 1997).

Este grupo comprende 18 especies reconocidas hasta la fecha (Aguirre-Sánchez et al., 2023), e incluye patógenos oportunistas responsables del 3-6% de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) en América del Norte, afectando principalmente a hospederos inmunocomprometidos, niños y lactantes (Aguirre-Sánchez et al., 2023; Manganello et al., 2001).

Además, debido a su presencia en múltiples nichos con los que el ser humano tiene contacto de manera frecuente, y a su creciente resistencia frente a diversos antimicrobianos, la OMS clasifica la evitabilidad de infecciones causadas por este género como *baja* según las medidas actuales (OMS, 2024; Liu et al., 2021).

**Tabla 1. Resultados de las evaluaciones de *Citrobacter spp.* mediante Análisis de Decisiones con Criterios Múltiples (MCDA) presentado en la lista de patógenos bacterianos prioritarios.**  
Adaptada de OMS, 2024.

|                                                              |                             |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Tasa de letalidad                                            | Media (11-20%)              |
| Incidencia global de casos por millón de habitantes          | Baja-Media (100-1000 casos) |
| Años vividos con discapacidad (AVD) por millón de habitantes | Baja (<0.1 AVD)             |
| Tendencia en 10 años de la tasa de resistencia               | Nivel 2: tendencia estable  |
| Transmisibilidad                                             | Media                       |
| Evitabilidad según las estrategias disponibles               | Baja                        |
| Tratabilidad                                                 | Media                       |
| Probabilidad de tratamiento en el futuro                     | Posible                     |

### **1.3.1. Importancia clínica de *C. freundii* y *C. amalonaticus***

Como se mencionó con anterioridad, *Citrobacter* spp., son habitantes comensales del tracto intestinal de humanos y otros animales. Sin embargo, en pacientes con inmunidad comprometida, comorbilidades o neonatos, pueden ser causantes de diversas enfermedades, como infecciones del tracto urinario (ITU), gastroenteritis, neumonía, diarrea infecciosa, abscesos cerebrales, septicemia, meningitis, bacteriemia y endocarditis (Doran, 1999). Las infecciones nosocomiales por *Citrobacter* tienen una alta prevalencia, ya que el 85% de los casos registrados entre 2000 y 2022 ocurrieron en pacientes previamente hospitalizados (Fonton et al., 2024).

Entre las principales especies patógenas se encuentra *C. freundii*, a la cual se le atribuye una tasa de mortalidad del 6.8% con un incremento significativo entre 17.8%-56% en casos de bacteriemia (Monhanty et al., 2007). Por ejemplo, en el Occidente de Uttar Pradesh, India, se reportó una tasa del 28.57% en un brote dentro de una unidad de cuidados intensivos neonatales (Jindal & Agarwal, 2022). Además, la capacidad patogénica de esta especie está respaldada por el análisis de su viruloma, que incluye proteínas involucradas en procesos clave como adherencia, motilidad, invasión, formación de biopelículas, antifagocitosis y síntesis de toxinas neurovirulentas (Pepperell et al., 2002; Ramsamy et al., 2020; Aguirre-Sánchez et al., 2023; Plakkal et al., 2013).

Por otro lado, aunque las infecciones por *C. amalonaticus* son menos comunes, se han reportado casos de peritonitis asociada a diálisis peritoneal, enfermedades similares a la fiebre entérica, ITU y meningitis; estos casos suelen estar vinculados a pacientes con factores de riesgo como diabetes mellitus o comorbilidades (Jabeen et al., 2023; Wong et al., 2012; Suwansrinon et al., 2005).

### **1.4. Resistencia a antibióticos**

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, se han realizado numerosas investigaciones para identificar las causas y mecanismos detrás de la ineficacia de los medicamentos en el tratamiento de ciertas infecciones, lo que aún representa un desafío constante para la salud pública global. Entre 1990 y 2021, más de un millón de personas murieron anualmente debido a infecciones por patógenos resistentes a

antibióticos. Se estima que, para 2050, esta cifra incrementará a 1.91 millones de muertes al año, además de 8.22 millones de personas que fallecerán por enfermedades asociadas (Naddaf, 2024).

La capacidad de un microorganismo de sobrevivir a la concentración terapéutica de un antibiótico puede clasificarse como *intrínseca*, cuando es una propiedad innata de la especie, o como *extrínseca*, al ser adquirida (Camacho, 2023; Valdés et al., 2017). En el caso del género *Citrobacter*, las cepas clínicas presentan ambas resistencias frente a una amplia variedad de antimicrobianos. Estas incluyen de manera intrínseca a los  $\beta$ -lactámicos, y adquirida a quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, trimetoprim-sulfametoxazol y colistina (Pepperell et al., 2002 ; Yuan et al., 2019 ; Liu et al., 2021).

Por ejemplo, en una muestra clínica de ITU, se identificó *C. amalonaticus* multirresistente, principalmente a carbapenémicos y a colistina, mediada por plásmidos, además de sensibilidad reducida a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol (Facone et al., 2019; Ramsamy et al., 2020 ; Kumar et al., 2021).

#### 1.4.1. Mecanismos de resistencia antibiótica en *Citrobacter* spp.

Los principales mecanismos de resistencia en *Citrobacter* spp. incluyen la inactivación de antibióticos por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), expresión de bombas de eflujo, eliminación o alteración de proteínas de membrana externa (porinas), y formación de biopelículas [Tabla 2] (Yuan et al., 2019 ; Yao et al., 2021 ; Chenhaka et al., 2023 ; Ma et al., 2024).

**Tabla 2. Principales mecanismos de resistencia reportados en *Citrobacter* spp.**

| Antibiótico         | Mecanismo de resistencia                  | Enzima o diana                     | Genes                     | Referencias                                                                                                |
|---------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\beta$ -lactámicos | Rompimiento del anillo $\beta$ -lactámico | $\beta$ -lactamasas Clase Ambler A | SHV, TEM, KPC, CTX-M, CMY | (Pepperell et al., 2002 ; Yuan et al., 2019 ; Liu et al., 2020 ; Yao et al., 2021 ; Chenhaka et al., 2023) |
|                     |                                           | metalo- $\beta$ -lacta             | NDM                       | (Ramsamy et al., 2020 ; Kumar et al., 2021 ; Yao et al., 2021)                                             |

|                 |                                                |                                                  |                                       |                                                                                      |
|-----------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|                 |                                                | masas<br>Clase Ambler<br>B                       |                                       |                                                                                      |
|                 |                                                | metalo- $\beta$ -lactamasas<br>Clase Ambler<br>D | OXA                                   | (Aguirre-Sánchez et al., 2023 ;<br>Ma et al., 2024)                                  |
|                 | Cambio en la permeabilidad de membrana externa | Porinas                                          | <i>ompF, ompC</i>                     | (Yang et al., 2010 ; Yao et al., 2021)                                               |
| Quinolonas      | Mutación en el objetivo                        | ADN girasa                                       | <i>gyrA</i>                           | (Liu et al., 2020 ; Ramsamy et al., 2020)                                            |
|                 |                                                | Topoisomerasa IV                                 | <i>parC</i>                           | (Liu et al., 2020)                                                                   |
|                 | Modificación en sitio de acción                | Complejo ADN-Topoisomerasa                       | <i>qnr</i>                            | (Yuan et al., 2019 ; Liu et al., 2020 ; Liu et al., 2021 ;<br>Chenhaka et al., 2023) |
|                 | Expulsión de antibiótico                       | Bombas de eflujo                                 | <i>emrAB/TolC, patA, mdtHK</i>        | (Chenhaka et al., 2023)                                                              |
| Aminoglucósidos | Enzimas inactivadoras de fármaco               | Enzimas modificadoras de aminoglucósidos         | <i>dhfr1, ant(3'')-1b, aac(3)-IId</i> | (Pepperell et al., 2002 ; Yao et al., 2021)                                          |
|                 | Expulsión de antibiótico                       | Bomba de eflujo                                  | <i>acrD</i>                           | (Chenhaka et al., 2023).                                                             |
| Macrólidos      | Enzimas inactivadoras de fármaco               | Enzimas modificadoras de macrólidos              | <i>mphA, mphE</i>                     | (Aguirre-Sánchez et al., 2023)                                                       |
|                 | Expulsión de antibiótico                       | Bomba de eflujo                                  | <i>acrAB-TolC, mdtG</i>               | (Chenhaka et al., 2023)                                                              |
| Tetraciclinas   | Protección ribosómica                          | Subunidad 30S del ribosoma                       | <i>tetM</i>                           | (Chopra & Roberts, 2001 ;<br>Aguirre-Sánchez et al., 2023)                           |
|                 | Expulsión de antibiótico                       | Complejo de bombas de eflujo                     | <i>tetA, tetB, tetC, tetD</i>         | (Chopra & Roberts, 2001 ;<br>Aguirre-Sánchez et al., 2023)                           |

En cuanto a las **BLEE**, se ha reportado que *C. amalonaticus* produce la metalo- $\beta$ -lactamasa NDM-1, lo que confiere resistencia a los carbapenémicos (Ramsamy et al., 2020; Kumar et al., 2021). Por su parte, en *C. freundii* se han identificado diversos genes relacionados BLEE, como *bla TEM-1*, *bla SHV-12*, *bla CTX-M-15* (Pepperell et al., 2002; Yuan et al., 2019; Liu et al., 2020) y *bla KPC-2* (Yao et al., 2021). Estas enzimas hidrolizan irreversiblemente el núcleo betalactámico de los antibióticos, perdiendo su capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular y permitiendo la proliferación bacteriana.

Las **bombas de eflujo**, son sistemas celulares que expulsan antibióticos fuera de la célula bacteriana. En *C. freundii* se han identificado tres principales sistemas de bombas de eflujo implicados en la resistencia a diversos antimicrobianos, incluidas las tetraciclinas: el casete de unión a ATP (ABC), la superfamilia de facilitadores principales (MSF) y el sistema resistencia-nodulación-división celular (RND) (Angarita et al., 2024; Yuan et al., 2019; Ramsamy et al., 2020; Liu et al., 2021).

La alteración de la permeabilidad de la membrana externa por trastornos en la expresión de **porinas**, también juega un papel clave. Por ejemplo, en aislados clínicos de *C. freundii*, se han observado alternancias de nucleótidos en los genes *ompC* y *ompF*, lo que podría contribuir a una menor susceptibilidad a los carbapenémicos (Yang et al., 2010; Yao et al., 2021).

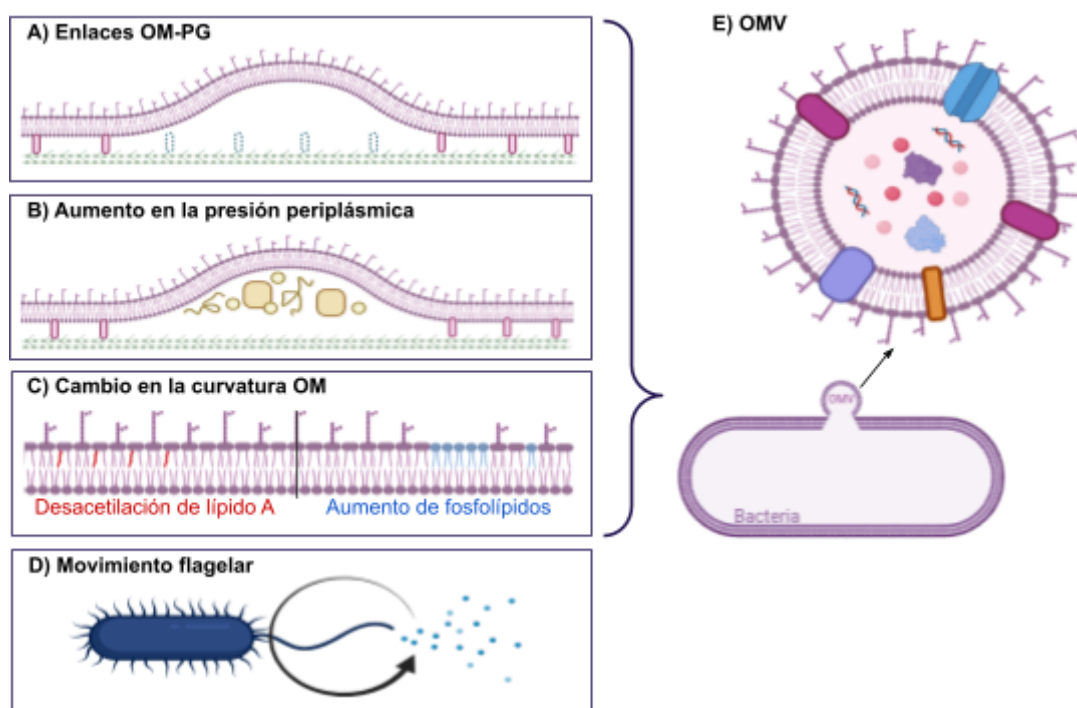
Por último, la formación de **biopelículas** (biofilms) en respuesta al estrés por antibióticos o escasez de nutrientes, protege las células en una matriz que actúa como barrera física y microambiente. Un estudio filogenético, identificó proteínas del sistema de secreción tipo VI involucradas en la formación de biopelículas, sin embargo, se sugiere que los genes involucrados en el género de *Citrobacter*, podrían ser adquiridos por transferencia horizontal de genes (HGT) (Yuan et al., 2019).

Aunado a los factores de resistencia antes mencionados, en los últimos años se ha reportado la presencia de integrones, compuestos antagonistas, modificaciones en el sitio de unión y secreción de *microvesículas de membrana externa*, lo que representa un desafío significativo para los tratamientos convencionales (Pepperell et al., 2002; Yao et al., 2021; Liu et al., 2020; Ramsamy et al., 2020). Como se abordará más adelante, las OMV's además de proteger a la célula progenitora del

efecto de fármacos al fungir como señuelo de unión, tienen un papel novedoso y determinante en la diseminación de genes de resistencia a múltiples antimicrobianos.

### 1.5. Vesículas de membrana externa (OMV's )

Las bacterias Gram negativas, como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Porphyromonas gingivalis*, tienen la capacidad de liberar vesículas extracelulares, las cuales se pueden clasificar según su composición y origen en vesículas líticas—EOMV's (*explosive outer membrane vesicles*) y OIMVs (*outer inner membrane vesicles*)—y vesículas no líticas—OMV's (*outer membrane vesicles*). En el caso de estas últimas, se han descrito cuatro mecanismos de biogénesis: reducción o modificación de los enlaces entre la membrana externa (OM) y el peptidoglicano (PG), aumento de la curvatura de la OM, incremento de la presión periplásmica, y por liberación flagelar [Figura 1, A-D] (Juodeikis y Carding, 2022; Aschtgen et al., 2016).

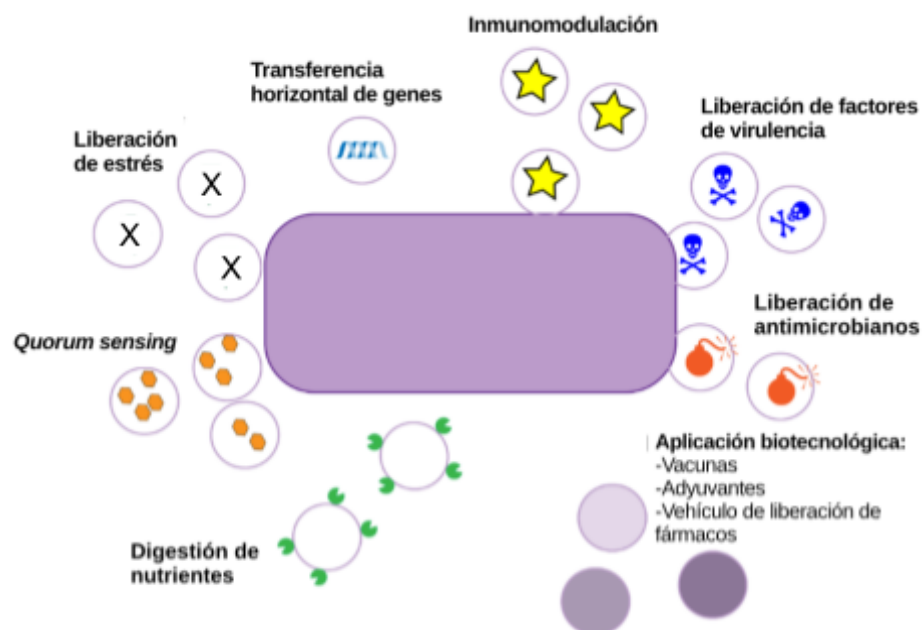


**Figura 1. Mecanismos de biogénesis de las OMV's.** Del lado izquierdo se observan las vías de biogénesis reportadas: (A) reducción en los enlaces entre OM y PG, (B) aumento de la curvatura de la OM por la desacetilación en la estructura del lípido A o enriquecimiento en fosfolípidos, (C) aumento de la presión periplásmica por proteínas mal plegadas, PG o lipopolisacáridos, y (D) la fuerza de corte generada por la rotación del flagelo puede ser suficiente para liberar las vesículas.

Del lado derecho, (E) se aprecia la estructura de las OMV's, destacando las proteínas de membrana compartidas con la bacteria secretora y las diferentes biomoléculas en su cargo. Elaboración propia.

Particularmente, las vesículas de membrana externa son estructuras esféricas con un tamaño entre 20 a 250 nm, y un cargo asociado a proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos, proteínas, toxinas, ADN, ARN, y otros factores bioactivos, lo que las convierte en importantes mediadores de procesos biológicos en el entorno microbiano [Figura 1, E] (Collins y Brown, 2021).

Las OMV's se consideran factores de virulencia, ya que participan en la comunicación intracelular y extracelular, la regulación de la respuesta inmune en el hospedero, la inducción de piroptosis en macrófagos, la transferencia horizontal de genes de resistencia, el *quorum sensing* (Sartorio et al., 2021; Dhital et al., 2021); además pueden actuar como señuelos de unión a antibióticos, degradando el medicamento y promoviendo la integridad del microorganismo (Schwechheimer y Kuehn, 2015) [Figura 2].

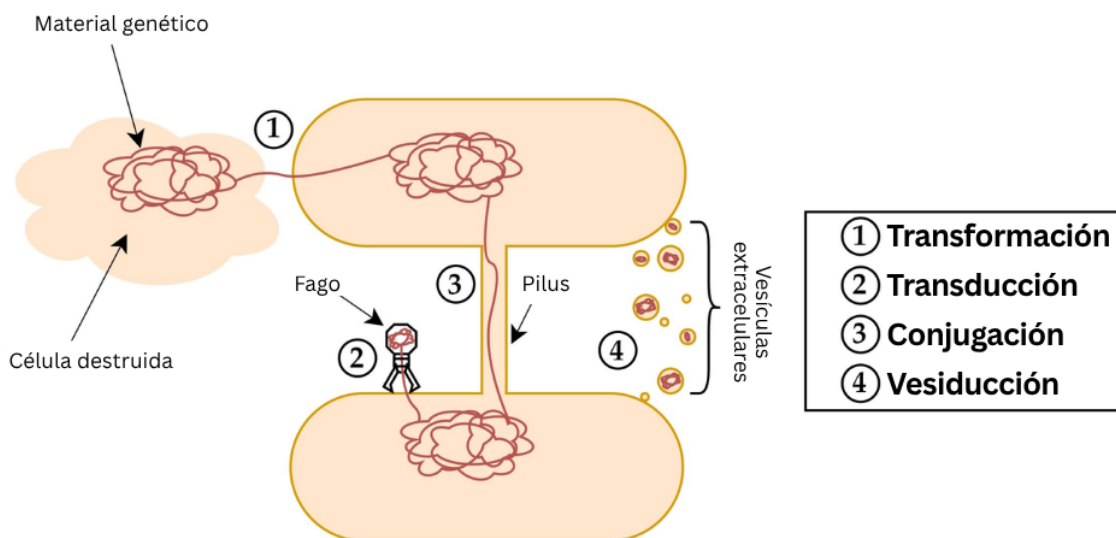


**Figura 2. Funciones de las microvesículas de membrana externa (OMV's).** (★) Biomoléculas y enzimas inmunomoduladoras, (☠) factores de virulencia como toxinas, proteasas y LPS, (💣) agentes antimicrobianos, (🌱) digestión de nutrientes mediante enzimas extracelulares, (◆) moléculas señalizadoras para *quorum sensing*, (X) liberación de estrés, (🧬) transferencia horizontal de genes de resistencia por DNA, RNA o plásmidos. Adaptado de Sartorio et al., 2021.

Las características y el cargo de las OMV's secretadas pueden variar según el patógeno y microambiente en que se liberan. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* las microvesículas derivadas de la biopelícula presentan un tamaño menor en comparación a las derivadas de crecimiento en placa, además de un cargo prioritariamente asociado a DNA plasmídico, lo que contribuye a una mayor eficiencia en la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos en bacterias competentes (Johnston et al., 2023).

### 1.5.1. Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes (HGT, siglas en inglés) es un mecanismo crítico de la evolución bacteriana que permite el intercambio de material genético entre bacterias, facilitando con ello la adaptación y la diversidad. A nivel genético existen tres vías principales por las que se da la HGT asociada a genes de resistencia: transducción, transformación y conjugación (Camacho, 2023; Blakely, 2024; Furuya & Lowy, 2006); sin embargo, en los últimos años la investigación alrededor de las OMV's las propone como un nuevo mecanismo (Marinacci et al., 2023).



**Figura 3. Mecanismos de transferencia horizontal de genes.** (1) Durante la transformación, la bacteria capta material genético libre; (2) la transducción es mediada por bacteriófagos; (3) en la conjugación la transferencia genética depende del contacto directo entre bacterias. En algunas enterobacterias sucede por un puente citoplasmático en el pili tipo F; (4) por el cargo asociado a

vesículas extracelulares. Adaptado de Marinacci et al., 2023.

La **vesiducción** es mediada por OMV's, las cuales juegan un papel importante gracias a su capacidad de encapsular material genético, protegiéndolo de la degradación por nucleasas extracelulares, facilitando su transporte a células receptoras y promoviendo la diseminación de factores de resistencia antimicrobiana y virulencia. Este fenómeno ha sido descrito en patógenos como *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., y *Salmonella typhi* (Collins & Brown, 2021).

### 1.5.2. Respuesta inmune por OMV's

Gracias a su diverso contenido molecular, las OMV's tienen la capacidad de modular o reprimir respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en el hospedero. Los LPS y otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) expuestos en su membrana pueden ser reconocidos por receptores celulares tipo Toll (TLRs) y NOD. Esta interacción activa cascadas de señalización que promueven la producción de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de células inmunes al sitio de infección (Juodeikis y Carding, 2022). Sin embargo, esta relación no siempre beneficia al hospedero, ya que las OMV pueden fungir como señuelos de unión y vehículos de proteínas inmunomoduladoras, factores de virulencia o pequeños ARN regulatorios (sRNA) capaces de silenciar genes específicos, promoviendo la evasión de la respuesta inmune. Por ejemplo, esto ha sido descrito con las vesículas secretadas por *Burkholderia pseudomallei*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Koeppen et al., 2016; Lee et al., 2021; Baker et al., 2021; Davis et al., 2006).

Por otra parte, se ha demostrado que las OMV's poseen no solo capacidad inmunogénica, sino también adyuvante, lo que les confiere propiedades importantes como vehículos vacunales. A finales de los años 70 y principios de los 80, las tasas de infección por *Neisseria meningitidis* incrementaron de manera importante en Cuba y Noruega, alcanzando su punto máximo de casos en 1983. En respuesta, el Instituto Finlay de La Habana, Cuba, desarrolló VA-MENGOC-BC, la primera vacuna de OMV's aprobada, con una eficacia estimada del 83% (Sierra-González, 2019; Bjune et al., 1991).

Actualmente, existen otras formulaciones basadas en microvesículas autorizadas para la prevención de enfermedades causadas por *N. meningitidis* serogrupo B (VA-MENGOC-BC, Bexsero, MenZB) y *Haemophilus influenzae* tipo b (PedvaxHib); además, hay varios candidatos en desarrollo clínico contra otros patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Bordetella pertussis* (Pschunder et al., 2024; Petousis, 2018; Micoli et al., 2024).

### **1.6. Modelo experimental**

El *modelo murino BALB/c* es ampliamente usado en la investigación biomédica, particularmente en cáncer, enfermedades cardiovasculares e inmunología, por su fácil manejo, perfil genético bien caracterizado y constante. Además, se ha reportado que generan una respuesta humoral eficiente tras la inmunización con vesículas extracelulares bacterianas, promoviendo la producción de anticuerpos policlonales específicos contra los antígenos presentes en las OMV's (Huang et al., 2019).

La administración de microvesículas a modelos animales puede ser vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral o intraperitoneal, según el objetivo terapéutico, el perfil de respuesta inmune deseado, los requisitos de biodisponibilidad y el biomodelo en sí mismo. La administración por vía *intraperitoneal* promueve la activación de células presentadoras de antígenos, estimula la producción de citocinas proinflamatorias y modula la respuesta inmune adaptativa, lo que resalta su potencial inmunogénico (Lieberman, 2022).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Antecedentes generales**

Como se ha mencionado anteriormente, la secreción de microvesículas de membrana externa está estrechamente asociado a la patogenicidad bacteriana. Por ejemplo, las OMV's de *V. cholerae* favorecen la liberación de la toxina colérica activa al protegerla de la acción de proteasas intestinales (Zingl et al., 2021), y en otros microorganismos como *E. coli* o *Pseudomonas syringae* fungen como señuelos para la unión de los antibióticos dirigidos a membrana, reduciendo la concentración

disponible en el medio extracelular y protegiendo a la bacteria (Kulkarni et al., 2014; Weng et al., 2023).

En los últimos años se ha estudiado también la capacidad de las OMV's para transportar enzimas degradativas o genes de resistencia a antibióticos. Tal es el caso de *Acinetobacter baumannii*, un coccobacilo Gram-negativo, cuyas OMV's pueden contener  $\beta$ -lactamasas de clase D y  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC que hidrolizan los carbapenémicos  $\beta$ -lactámicos (Liao et al., 2015; Wu et al., 2016), además, se ha reportado que en su cargo pueden contener pequeños RNAs (sRNAs) o plásmidos que codifican para variantes de  $\beta$ -lactamasas NDM (Sarshar et al., 2022; López et al., 2019).

Además, dado que las OMV's comparten componentes de la membrana externa y patrones moleculares asociados a patógenos con su célula parental, pueden inducir respuestas inmunes similares a las generadas por la bacteria de origen. En consecuencia, los sueros hiperinmunes obtenidos tras la inmunización con microvesículas de distintas especies bacterianas han surgido como una herramienta prometedora para el tratamiento de infecciones. Por ejemplo, los sueros anti-OMV's derivados de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *S. paratyphi*, han demostrado promover una regulación positiva de la opsonización bacteriana (Hadadi et al., 2021; Howlander et al., 2018). De manera similar, un estudio *in vitro* reportó que el uso combinado de inmunoglobulinas IgG anti-AbOMV con quinolonas incrementa significativamente la sensibilidad de *A. baumannii* a los antibióticos (Huang et al., 2019).

## 2.2. Antecedentes particulares

En el estudio realizado en 2021 por Leyva, H., se realizó un análisis de muestras provenientes de aguas termales de un balneario y de fuentes destinadas al consumo humano en la localidad de Tehuacán, Puebla. Mediante la aplicación de pruebas bioquímicas y espectrometría de masas asistida por desorción/ionización láser y matriz (MALDI-TOF MS), se logró la identificación de bacterias patógenas, destacando entre ellas *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* (Leyva, comunicación directa).

Ambas especies son capaces de secretar microvesículas de membrana externa (OMV's ), particularmente las de *C. freundii* presentan un tamaño aproximado entre 20-50 nm y una tendencia a aglomerarse entre ellas. Además, se identificó mediante PCR, un cargo molecular importante asociado a enzimas betalactamasas, lo que favorece la supervivencia bacteriana en medio de cultivo con ampicilina y su capacidad de transferir horizontalmente genes BLEE interespecie, a *E. coli* DH5 $\alpha$  (Juárez, 2023).

Por otra parte, se demostró que las OMV's de *Klebsiella pneumoniae* (KpBUAP021, KpBUAP003 y KpATCC700603) son capaces de inducir la respuesta inmune humoral en el modelo murino BALB/c al administrarse vía intraperitoneal junto al adyuvante Titer Max Gold (SIGMA), y que la concentración e isotipos predominantes entre los anticuerpos obtenidos para cada cepa tienen diferencias según la inmunogenicidad de los antígenos presentes en sus respectivas microvesículas (Espinosa, 2024).

### 3. Justificación

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una de las principales amenazas para la salud pública global, ya que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que para 2050, las muertes por infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos podrían superar las muertes anuales ocasionadas por cáncer. Dentro de este problema, el género *Citrobacter* ha sido ampliamente estudiado por su resistencia intrínseca y adquirida a múltiples fármacos, como betalactámicos, aminoglucósidos, cefalosporinas de 3ª generación, quinolonas y macrólidos.

Un aspecto relevante en este contexto es la capacidad de estas bacterias de secretar vesículas de membrana externa (OMV's), las cuales pueden facilitar la transferencia horizontal de genes asociados con resistencia a antibióticos, patogenicidad y factores de virulencia hacia otras bacterias intra e interespecie. Lo anterior, podría incluir patógenos prioritarios, como los del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.),

promoviendo su resistencia a las terapias actuales y representando un riesgo significativo para la salud global.

Por otro lado, la caracterización de la respuesta inmune inducida por las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* es fundamental para su posible uso como tratamiento alternativo, dado su potencial para inhibir la colonización bacteriana.

#### **4. Hipótesis**

Las microvesículas de membrana externa secretadas por *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* presentarán un cargo molecular asociado a la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos; por su parte, los antígenos de superficie serán capaces de generar una respuesta inmune específica en modelos murinos caracterizada por la producción de anticuerpos policlonales anti-OMV's.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. Objetivo general**

Evaluar el potencial de las microvesículas de membrana externa de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* en la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos y caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por sus OMV's en modelos murinos.

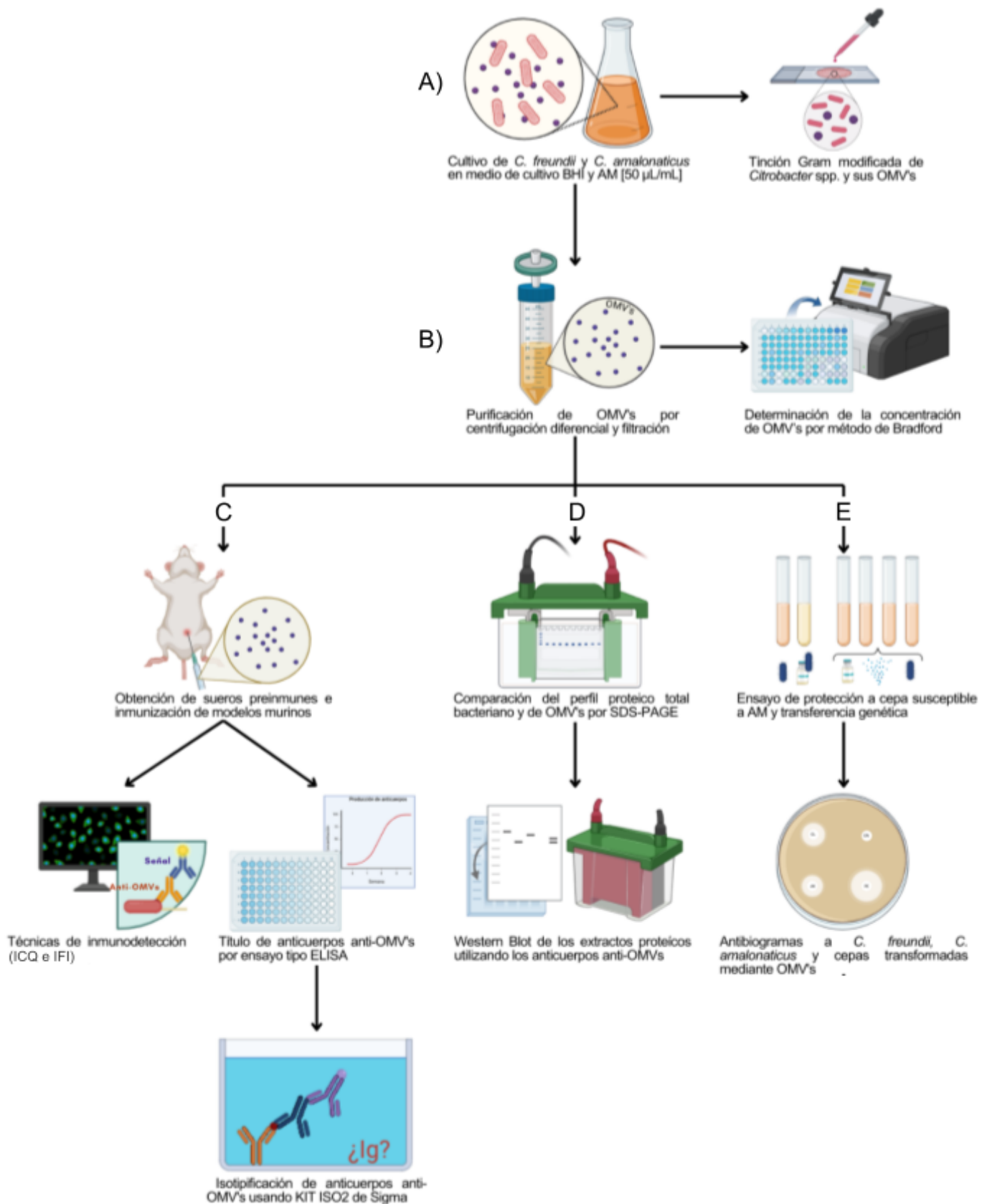
##### **5.2. Objetivos específicos**

1. Inducir la hipervesiculación de *C. freundii* y *C. amalonaticus* en condiciones de estrés mediada por antibióticos.
2. Evaluar el fenotipo de resistencia a antibióticos adquirido mediante la transferencia genética por OMV's a *E. coli* DH5 $\alpha$  no resistente.
3. Obtener anticuerpos policlonales anti-OMV's en ratones BALB/c
4. Caracterizar la respuesta inmunológica generada por OMV's de *Citrobacter* spp. en un modelo murino.

5. Identificar cualitativamente la presencia de proteínas inmunogénicas en OMV's purificadas a través de ensayos de inmunodetección.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Esquema general de trabajo



**Figura 4. Diseño experimental.** (A) Cultivo de *Citrobacter* e hipervesiculación; (B) Purificación y cuantificación de OMVs; (C) Inmunización de biomodelo y ensayos con anti-OMVs; (D) Comparación

del perfil proteico y Western blot; (E) Ensayo de protección mediada por OMV's a *E. coli* y prueba de sensibilidad con antibiogramas. Elaboración propia.

## **6.2. Resembrado de las cepas de *C. freundii* y *C. amalonaticus***

En una investigación previa se realizaron muestreos de aguas termales del balneario “San Lorenzo” ubicado en la localidad de Tehuacán, Puebla, y mediante técnicas rutinarias de microbiología y Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Microflex LT), se realizó la identificación de *C. freundii* y *C. amalonaticus*; éstas bacterias, fueron preservadas en crioviales a -80°C.

Para el presente trabajo se recuperaron las bacterias a partir de los crioviales, se sembraron por estría cruzada en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB), se etiquetaron de manera rutinaria y se incubaron a 37°C por 24 h.

## **6.3. Secreción de OMV's en medio con estrés**

A partir de las colonias obtenidas del crecimiento en placa, se obtuvo una asada y se realizó un precultivo en medio líquido para la posterior expresión de microvesículas. Para ello, se prepararon tubos de ensayo con 5 ml y matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio Infusión cerebro-corazón (BHI), cada uno adicionado con 100 µg/ml de Ampicilina (AM). Una vez inoculados los tubos e incubado a 37°C por 24 h, se vertió el volumen total en los respectivos matraces y se mantuvo en las mismas condiciones durante 5 días. Esto con la finalidad de inducir una hiper vesiculación por parte de *Citrobacter* ante el estrés generado por el antibiótico, comportamiento que se observó a través de un microscopio óptico marca Motic usando tinción de Gram convencional y modificada para la identificación OMV's.

## **6.4. Purificación de OMV's por centrifugación diferencial y filtración**

Según el protocolo descrito por Klimentová & Stulík (2015), con la finalidad de separar las células bacterianas por gradiente de densidad, se centrifugó el volumen total de cultivo de cada cepa a 6000 rpm por 50 min a 4°C (Centrífuga refrigerada Centurion PRO-K1015R) y se recuperó el sobrenadante para ser filtrado a través de membranas estériles de ésteres de celulosa mixtos (MF-Millipore™) con poros de

0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ . Para precipitar las microvesículas, se adicionó acetona fría en una proporción 1:1 y se mantuvo a 4°C por 24 h. Posteriormente se centrifugó por 30 min a 6000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla obtenida en 1 ml de PBS estéril [Anexo 2]; a este volumen, se le realizó una última centrifugación a 11000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (TA), se retiró el sobrenadante y a la pastilla resultante de OMV's purificadas se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer para conservarse a 4°C.

Finalmente, como prueba de esterilidad, se realizó el sembrado masivo de las OMV's purificadas en caja Petri con agar nutritivo, incubándolas a 37°C por 24 h.

### **6.5. Tinción de Gram para OMV's**

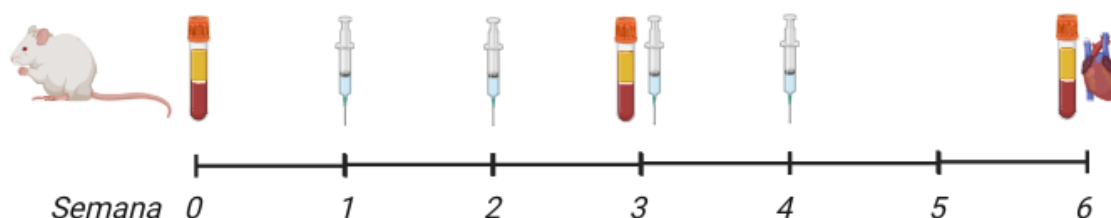
Para mejorar la visibilidad de las microvesículas presentes en el cultivo líquido se modificaron los tiempos de exposición a los reactivos de la tinción de Gram.

Se realizó un frotis con una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de medio BHI con AM de cada matraz y con las OMV's purificadas, se fijó con calor y se colocó sobre el puente de coloración, dónde se dejó teñir la muestra durante 2 min con cristal violeta. Se lavó con agua destilada y se cubrió la muestra con lugol. Transcurridos 2 min, se realizó la decoloración con alcohol-acetona durante 10 segundos y una vez lavado se dejó con safranina por 2 min, para finalizar con un lavado dejando secar en posición vertical. Por último, se colocó 1 gota de aceite de inmersión para observar bajo el objetivo de 100X en el microscopio óptico (Motic) la morfología bacteriana y la presencia de OMV's secretadas por cada especie.

### **6.6. Cuantificación de OMV's por método de Bradford**

Para determinar la concentración de las OMV's purificadas, se realizó su cuantificación utilizando el método de Bradford (Kilmentová & Stulík 2015; Kohl et al., 2018) y una curva de calibración construida con albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de 0.1 a 1.0 mg/ml. Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas (Accuris SmartReader™ 96 Microplate Absorbance Reader) a una longitud de onda de 595~600 nm.

### 6.7. Obtención de sueros inmunes y esquema de inmunización en modelo murino BALB/c



**Figura 5. Esquema de inmunización en modelo murino BALB/c para producción de anticuerpos policlonales anti-OMV's.** En la semana 0 y 3 se realizó una toma de muestra sanguínea de máximo 100  $\mu$ L a través de un corte de 1-2 mm desde el extremo de la cola; la semana 1, 2, 3 y 4 se realizaron inyecciones vía intraperitoneal compuestas por OMV's suspendidas en agua estéril y adyuvante; por último, en la semana 6 se sacrificó el biomodelo, se realizó la única extracción sanguínea cardíaca y se preservó el órgano en PFA al 4%. Elaboración propia.

Para la producción de anticuerpos específicos contra microvesículas de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus*, se asignó aleatoriamente dos ratones hembra BALB/c por cada especie estudiada. Para recolectar el suero preinmune, semana 0, se tomó una muestra de sangre a través de un corte de 1-2 mm desde el extremo de la cola, se limpió la zona y se aplicó presión suave para detener el sangrado. El esquema de inmunización constó de 4 inyecciones intraperitoneales, cada una compuesta por 10  $\mu$ g de OMV's suspendidos en 25  $\mu$ L de agua estéril, mezclados en una proporción 1:1 con el adyuvante TiterMax Gold (Sigma-Aldrich). Las inmunizaciones se administraron semanalmente, con un intervalo de una semana entre cada aplicación, permitiendo una adecuada respuesta inmunitaria, asegurando el bienestar y monitoreando cualquier signo de estrés o malestar en el modelo murino. En la semana 3, se tomó una muestra de sangre y finalmente, en la semana 6, el biomodelo fue sacrificado bajo anestesia general, se realizó una punción cardíaca para la obtención de anticuerpos a partir del suero sanguíneo y el corazón se fijó en PFA al 4% para posteriores estudios histológicos.

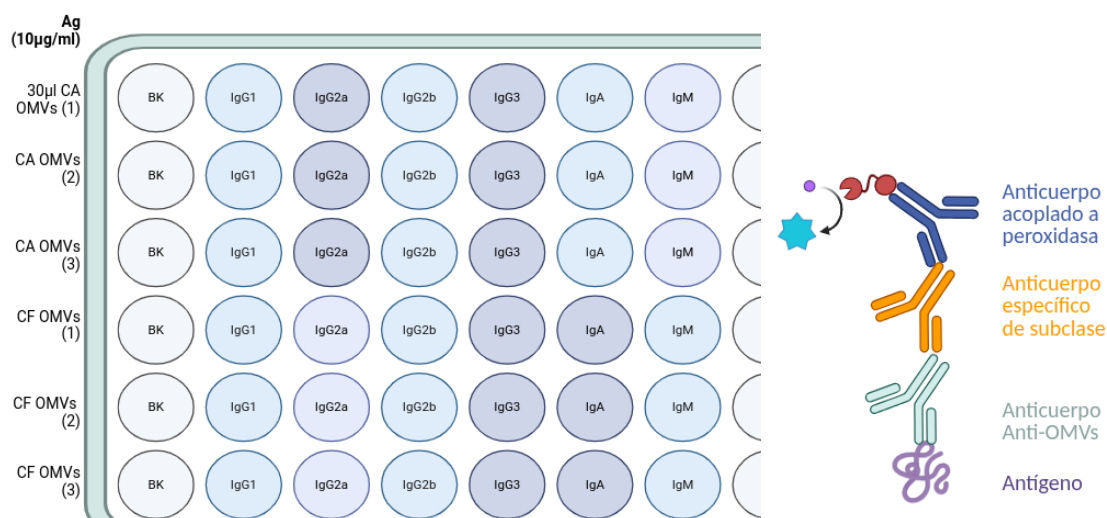
## 6.8. Título de anticuerpos

Para cuantificar la producción de anticuerpos con el esquema de inmunización propuesto, se diluyó cada muestra de suero hiperinmune en buffer PBS estéril a las siguientes proporciones: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 y 1:6400.

En una microplaca de ELISA de 96 pozos sin recubrimiento se adicionaron 10 µg/ml de OMV's por pozo de las microvesículas purificadas de *C. freundii* y *C. amalonaticus* para ser incubados a 4°C toda la noche, posteriormente se decantó e incubó a 37°C por 1 hr con 200 µL de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% con la finalidad de bloquear interacciones inespecíficas. Una vez decantado el volumen de BSA, se realizó por triplicado un lavado con buffer (PBS-Tween 20 al 0.05%) y se adicionaron 100 µL de los sueros de ratones, anti-OMV's Cf y anti-OMV's Ca, a las concentraciones previamente mencionadas. Después de 2 horas de incubación y 3 lavados, la placa se mantuvo 30 min a TA con 50 µL del segundo anticuerpo, anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa producido en cabra (SIGMA) en dilución 1:5000.

Finalmente se realizó cuatro veces un lavado con PBS-T 0.05% y se le añadieron 100 µL de TMB (SIGMA) para comenzar la reacción enzimática con resultado colorimétrico. Transcurridos 15 min, se adicionaron 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M y se realizó la lectura a  $\lambda=450$  nm en un lector de microplacas (Accuris SmartReader™ 96 Microplate Absorbance Reader).

## 6.9. Isotipificación de anticuerpos usando KIT ISO2 de Sigma



**Figura 6. Representación de ensayo de isotipificación de anticuerpos.** En la imagen se aprecia la disposición de los pozos en una microplaca para ELISA utilizada para la isotipificación de los anticuerpos producidos en modelo murino contra las microvesículas de membrana externa de *Citrobacter*; además del reconocimiento por el ensayo triple ELISA. Elaboración propia.

Tras incubar una microplaca de 96 pozos a 4 °C durante toda la noche con 30 µL de OMV's a una concentración de 10 µg/mL por pozo, se procedió a realizar un ensayo tipo ELISA triple para identificar la clase y subclase de los anticuerpos generados. Para ello se empleó el kit Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (ISO2) de SIGMA, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Una vez decantado el volumen, se bloqueó la placa con BSA al 1 % durante una hora. Posteriormente, se realizaron tres lavados con buffer PBS-Tween 20 al 0.05 %. Luego, se añadieron 100 µL de los anticuerpos anti-OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*, respectivamente, diluidos 1:1000. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, se repitieron los lavados y se agregaron 50 µL del segundo anticuerpo correspondiente a la subclase de inmunoglobulinas (1:1000).

Después de 30 min de incubación y realizar cuatro lavados, se adicionaron 50 µL del tercer anticuerpo: HRP-goat anti-rabbit IgG conjugado a peroxidasa (1:3000), el cual se mantuvo durante 30 minutos a TA. Tras realizar los lavados correspondientes, se añadió 100 µL de sustrato TMB, y transcurridos 10 minutos, la reacción enzimática se detuvo con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M. La absorbancia fue leída a 450 nm utilizando un lector de microplacas ELISA Accuris SmartReader™ 96, modelo MR9600.

Este procedimiento fue replicado utilizando extractos proteicos bacterianos como antígeno.

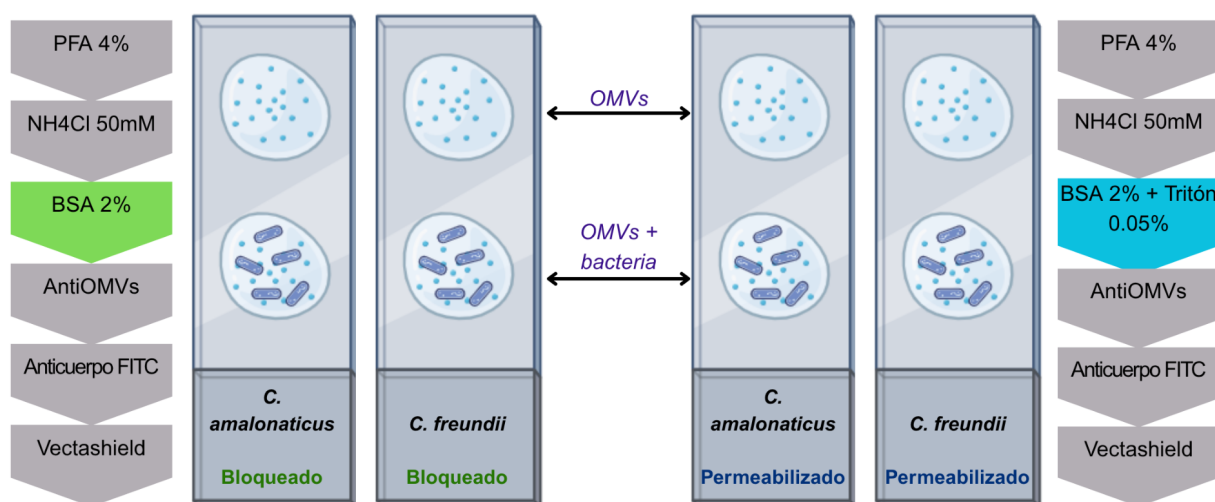
#### **6.9.1. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los experimentos de isotipificación (OMV's y extractos totales como antígeno de unión) se realizó mediante el software GraphPad Prism versión 9.5.1.

Para evaluar la distribución normal de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se aplicó una ANOVA de tres vías, considerando

como variables el isotipo, la especie bacteriana y el tipo de antígeno, seguido de una prueba post hoc de Tukey para comparación múltiple.

### 6.10. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta IFI



**Figura 7. Representación, ensayo de inmunofluorescencia indirecta con OMV's y células de *Citrobacter* spp.** Elaboración propia.

En un portaobjetos limpio se colocaron dos alícuotas de 20  $\mu$ L de OMV's purificadas y una de ellas se homogeneizó con una colonia de las bacterias correspondientes; esto se realizó por duplicado.

Dentro de una cámara húmeda, se fijaron las muestras con 30  $\mu$ L de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente por 30 min, se realizaron 3 lavados suaves con PBS, se añadió 50  $\mu$ L de HN<sub>4</sub>Cl (Merck Millipore) a 50 mM por 15 min y nuevamente se lavó con buffer estéril. Un conjunto de muestras se sometió a un tratamiento de bloqueo con albúmina al 2% durante 1 hora, mientras que el resto de las muestras se incubaron solo 30 min con BSA y posteriormente permeabilizaron con una solución de Tritón X-100 al 0.5% por 30 min [Figura 7], y se hicieron cuatro lavados con PBS.

El total de las muestras, se mantuvieron toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo anti-OMV's totales respectivo (1:1000). Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a FITC (1:500) por 48 hs a 4°C en una cámara húmeda protegida de la luz. Por

último, se realizó el montaje con 5 µL de Vectashield® Antifade Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories) y se observaron las muestras en un microscopio de epifluorescencia (Motic). Las imágenes fueron procesadas con el software AmScope.

#### **6.11. Inmunomarcaje con anticuerpo acoplado a fosfatasa**

En un portaobjetos limpio se fijó con calor una muestra homogénea de 20 µL de OMV's y bacterias, las cuales se incubaron 1 h a TA con 30 microlitros de BSA al 2%. Una vez lavados con PBS estéril, las muestras se mantuvieron en cámara húmeda a 4 °C toda la noche con el anticuerpo anti-OMV's de *Citrobacter freundii* o *Citrobacter amalonaticus* (1:1000), según el antígeno fijado en un inicio.

Se lavó el portaobjetos con PBS estéril, se adicionaron 50 µL del segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, previamente diluido en una relación 1:10000, y se mantuvo a 37°C durante 1 hora. Tras realizar los lavados correspondientes, se añadieron 50 µL de BCIP, un sustrato cromogénico artificial, para 15 min después, examinar las muestras utilizando un microscopio óptico de la marca Motic.

#### **6.12. Obtención del perfil proteico de extractos totales de *C. freundii*, *C. amalonaticus* y de las OMV's secretadas**

Para obtener el perfil proteico de extractos totales bacterianos, se tomaron dos asadas grandes del cultivo en agar LB y se resuspendieron en 500 µL de PBS, esto se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de PBS, 100 µL de inhibidor de proteasas 1x y 400 µL de buffer RIPA modificado [Anexo 3]. Una vez homogeneizada la muestra, mediante agitación por vortex, se mantuvo 72 h a 4°C.

Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 12000 rpm 10 min, se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se le agregó acetona fría en una proporción 1:1, para precipitar las proteínas a 4°C toda la noche. Para finalizar, se centrifugó en las condiciones antes mencionadas, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 200 µL de PBS, repitiendo este proceso por duplicado.

Por otra parte, el perfil proteico de las microvesículas se obtuvo llevando a ebullición durante 10 min 40 µg de las OMV's purificadas de la cepa y un volumen de buffer de carga para SDS-PAGE [Anexo 4].

### **6.13. Electroforesis SDS-PAGE**

Previo a la electroforesis se llevó a ebullición durante 5 min un tubo estéril con 40 µg de extractos proteicos totales bacterianos y buffer de carga de Laemmli 1X.

Se realizó la migración de proteínas usando buffer de migración tris-glicina en una cámara de electroforesis vertical Bio-Rad (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell) y un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% con 1 mm de espesor [Anexo 5]. En la fase concentradora se cargó el volumen total correspondiente de cada muestra, es decir, el volumen resultante de mantener a 100°C durante el tiempo respectivo los 40 µg de los extractos proteicos de OMV's y extractos totales bacterianos; además, en un pozo se cargaron 4 µL del marcador de peso molecular (Jena bioscience). La migración se llevó a cabo con un voltaje de 70 y 150 V, para el gel concentrador y el separador respectivamente.

Una vez terminada la migración electroforética, el gel se mantuvo en agitación constante durante 24 horas con azul de Coomassie y posteriormente, en solución decolorante de metanol, ácido acético y agua tridestilada, hasta lograr observar bandas bien definidas.

### **6.14. Western blot. Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa**

Se realizó un Western Blot para detectar proteínas específicas en los extractos totales bacterianos y de microvesículas de membrana externa, para ello fue necesario reservar un gel de poliacrilamida del protocolo anterior sin teñir. Para transferir las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se utilizó un sistema de electrotransferencia húmeda a 70 V; transcurrida 1 h, la membrana se tiñó 5 min con rojo de Ponceau para verificar la transferencia. Una vez desteñida con PBS, se mantuvo con una solución al 4% de leche en polvo en PBS toda la noche a 4°C, con el objetivo de reducir la unión inespecífica de los anticuerpos.

A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico, anti-OMV's totales de *Citrobacter* producidos en ratón, en una dilución 1:1000

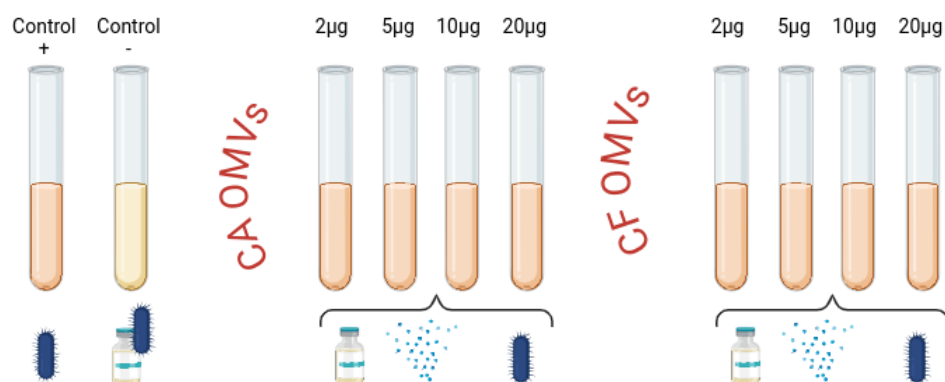
durante la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-T 0.05%, se añadió el anticuerpo secundario anti-mouse IgG acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000 y se incubó durante una hora a 37°C. Finalmente, se realizaron 3 lavados con buffer y se revelaron las bandas con 1 mL de BCIP/NBT.

#### **6.15. Ensayo de protección a cepa susceptible a antibióticos y transferencia genética**

Se prepararon tubos de ensayo de cristal con 3 ml de medio LB caldo, distribuidos en un control positivo, un control negativo, cuatro tubos destinados a las OMV's de *C. freundii* y cuatro a las OMV's de *C. amalonaticus*. Se adicionaron 1.5 µL de ampicilina AM (100 µg/mL) a todos los tubos, exceptuando el control positivo, además la concentración correspondiente de microvesículas en cada tubo (2, 5, 10, 20 µg) y se mantuvo 4 h en agitación.

Mientras tanto, se preparó una suspensión de *E. coli* DH5-α en PBS estéril, ajustada a una escala de 0.5 de McFarland y una vez transcurrido el tiempo de interacción, se adicionaron 100 µL a cada tubo. Finalmente, el ensayo se mantuvo a 37 °C durante 48 h y se midió la absorbancia a  $\lambda=600$  nm en un lector de microplacas (Accuris SmartReader™ 96 Microplate Absorbance Reader) como indicativo del crecimiento bacteriano de una cepa sensible a AM.

Con un asa estéril se tomó una muestra de las células que presentaron crecimiento y se sembraron por estría en placa petri LB con Ampicilina (100 µg/mL) para observar si mantenían el fenotipo de resistencia en condiciones diferentes, además, se resuspendieron 200 µL de las células en 800 µL de glicerol estéril para su preservación a -80°C.



**Figura 8. Esquema del ensayo de protección a cepa susceptible a ampicilina y transferencia genética**, en el que se observó el crecimiento de *E. coli* DH5α (cepa sensible a antibióticos) en un caldo de cultivo con ampicilina y OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus*. El frasco representa AM (100 µg/mL); la bacteria los 100 µL de *E. coli* DH5α; los puntos las OMV's. Elaboración propia.

**Tabla 3. Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para *E. coli* DH5α en contacto con OMV's de *C. amalonaticus*.** Elaboración propia.

| Tubo             | Contenido                                                                |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Control positivo | LB / <i>E. coli</i> DH5α                                                 |
| Control negativo | LB / AM / <i>E. coli</i> DH5α                                            |
| Problema A1      | LB / AM / 2 µg de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> / <i>E. coli</i> DH5α  |
| Problema A2      | LB / AM / 5 µg de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> / <i>E. coli</i> DH5α  |
| Problema A3      | LB / AM / 10 µg de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> / <i>E. coli</i> DH5α |
| Problema A4      | LB / AM / 20 µg de OMV's de <i>C. amalonaticus</i> / <i>E. coli</i> DH5α |

**Tabla 4. Ensayo de protección a antibióticos en tubos con medio líquido LB para *E. coli* DH5α en contacto con OMV's de *C. freundii*.** Elaboración propia.

| Tubo             | Contenido                                                                         |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Control positivo | LB / <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$                                                  |
| Control negativo | LB / AM / <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$                                             |
| Problema B1      | LB / AM / 2 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$  |
| Problema B2      | LB / AM / 5 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$  |
| Problema B3      | LB / AM / 10 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ |
| Problema B4      | LB / AM / 20 $\mu$ g de OMV's de <i>C. freundii</i> / <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ |

#### 6.16. Antibiógramas de *Citrobacter* spp. y *E. coli* transformada por microvesículas

Se realizaron cultivos masivos de *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus* y *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada por OMV's de cada una de las cepas problema en placas Petri con agar Mueller-Hinton. Siguiendo las instrucciones del proveedor, se colocaron sensidiscos MULTIBAC I.D. en una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo a escala 0.5 de MacFarland, se mantuvo en incubación a 37°C por 18-24 h y se registró el diámetro del halo de inhibición.

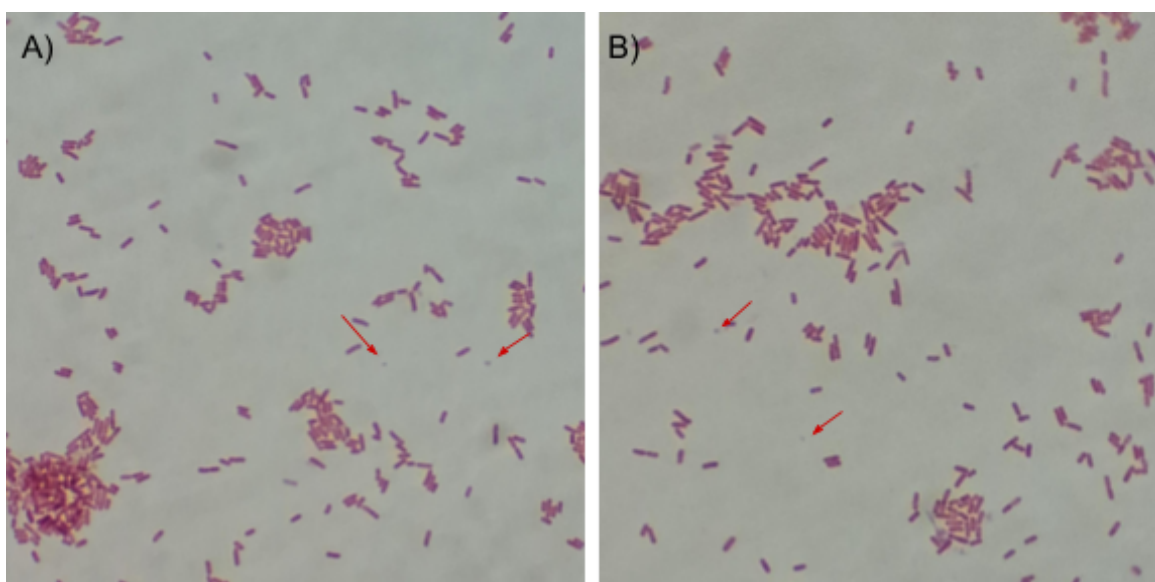
### 7. Resultados

#### 7.1. Identificación de OMV's por tinción de Gram modificada

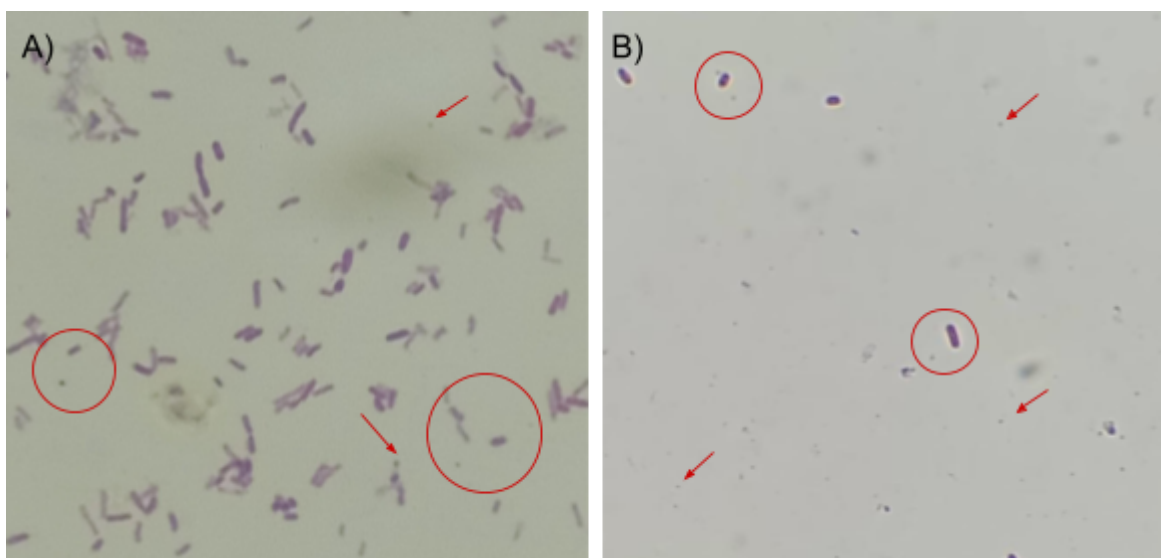
Las cepas de *C. freundii* y *C. amalonaticus* preservadas en glicerol a -80°C se recuperaron en agar LB, y posteriormente se sembraron en 5 mL de medio BHI caldo con ampicilina a una concentración de 50  $\mu$ g/mL para obtener un preinóculo al que se realizó tinción de Gram convencional. En ella se observaron las células

bacterianas con una coloración rosada-rojiza, mientras que las OMV's se tiñeron de color violeta tenue [Figura 9].

Posteriormente, los cultivos se mantuvieron 5 días a 37°C en 50 mL de las condiciones antes mencionadas y se realizó tinción de Gram para OMV's con la finalidad de corroborar la hipervesiculación inducida por el antibiótico; para ello se utilizó un microscopio óptico MOTIC con objetivo de 100x y cámara digital. Las observaciones revelaron la presencia de bacterias y microvesículas extracelulares, las cuales presentaban una morfología esférica y eran notablemente más pequeñas que las células bacterianas [Figura 10]. En la tinción de Gram se modificaron los tiempos de espera con cada colorante y se redujo la exposición al alcohol-acetona, por ello, ambas estructuras presentan una coloración violeta oscura.



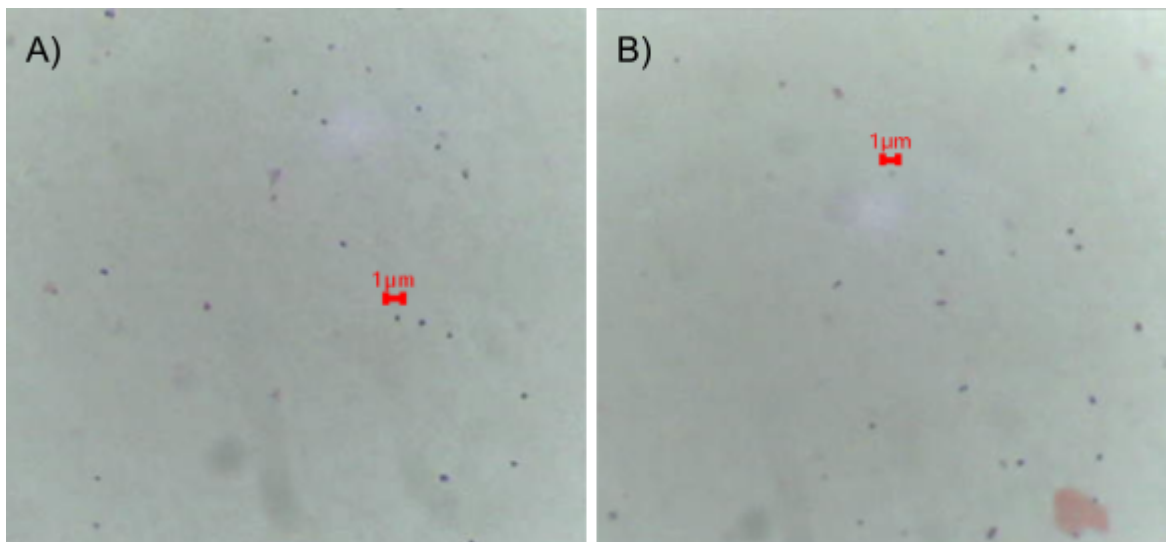
**Figura 9. Tinción de Gram convencional del preinóculo de *Citrobacter* spp.** (A) *C. amalonaticus*, (B) *C. freundii*. Se aprecian bacilos Gram negativos teñidos en color rosado-rojizo, por otro lado, se destacan con una flecha las estructuras esféricas violetas que corresponden a las OMV's secretadas en estas condiciones. Imagen a 100X y zoom digital 1.5X.



**Figura 10. Tinción de Gram modificada para OMV's de cultivos de *Citrobacter* spp.** (A) *C. amalonaticus*, (B) *C. freundii*. Se observa la tinción de células ( $\geq 1\mu\text{m}$ ) y OMV's ( $< 1\mu\text{m}$ ) secretadas y la diferencia de tamaño entre ellas dentro de las circunferencias. A su vez, las estructuras esféricas formadas por OMV's se destacan con una flecha. Imagen a 100X y zoom digital 2.2X.

La purificación de microvesículas se realizó mediante centrifugación diferencial y filtración, usando membranas de MCE con poros de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  para retener restos celulares. Las vesículas se mantuvieron toda la noche con acetona y se conservaron en PBS estéril, posteriormente, se les realizó prueba de esterilidad en diferentes medios [Anexo #] y se observaron mediante tinción de Gram modificada [Figura 11].

Usando un microscopio óptico, y objetivo 100x, se observaron agregados esféricos formados por microvesículas en un tono púrpura oscuro ( $< 1\mu\text{m}$ ) y se descartó la presencia de posibles contaminantes.



**Figura 11. Tinción de Gram modificada de OMV's purificadas.** (A) OMV's de *C. amalonaticus* (B) OMV's de *C. freundii*. Las OMV's tienden a aglomerarse entre ellas formando estructuras esféricas con mayor dimensión, pero menor a 1µm. Microscopio óptico Motic 100X y Zoom digital 2.5X.

## 7.2. Cuantificación de OMV's y perfiles proteicos bacterianos

Usando el método de Bradford y un lector de microplacas se determinaron las concentraciones de proteínas en los purificados de OMV's de *C. amalonaticus* y *C. freundii*. Obteniendo 2.16 µg/µl y 4.16 µg/µl respectivamente, en un volumen final de 250 µl. Por otra parte, los extractos totales bacterianos obtenidos tras el tratamiento con RIPA, tuvieron una concentración de 3.99 µg/µl de *C. amalonaticus* y 4.89 µg/µl de *C. freundii*.

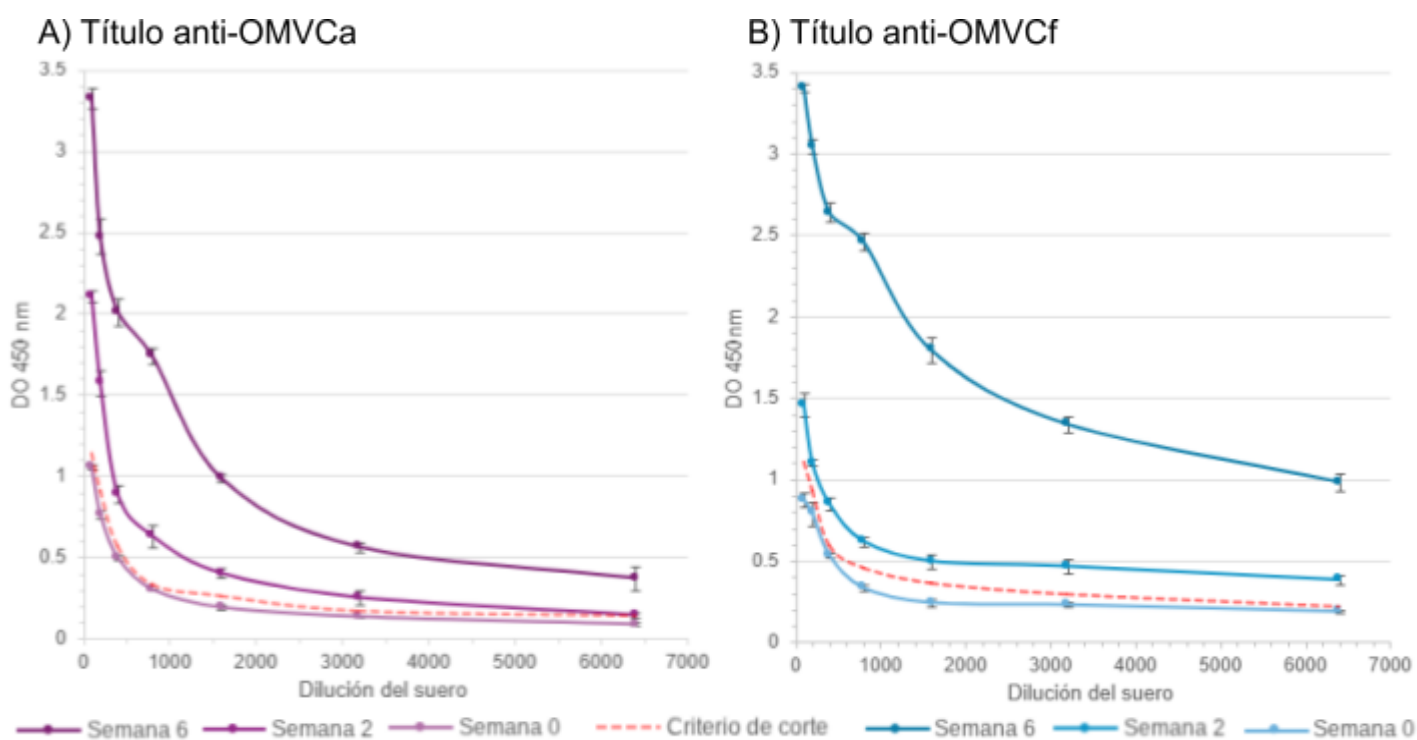
## 7.3. Respuesta inmune generada en biomodelo BALB/c

En el título de anticuerpos por ELISA de ambas cepas, se comparó la absorbancia resultante de los sueros sanguíneos recolectados previo a la inmunización (semana 0), dos semanas después de la primera dosis (semana 2) y dos semanas posteriores al último refuerzo (semana 6). Para el análisis se emplearon diluciones seriadas y los valores de absorbancia fueron corregidos respecto al blanco, además se definió como criterio de corte o positividad el valor de DO correspondiente a la media del control negativo (semana 0) más 3 veces su desviación estándar.

En ambos grupos experimentales, se observó un aumento progresivo en los valores de absorbancia conforme avanzaron las semanas post-inmunización, reflejando una respuesta dependiente del tiempo y la exposición al antígeno.

En los animales inmunizados con OMV's de *C. amalonaticus*, el suero correspondiente a la semana 6 alcanzó un título de 1/6400, mientras que en la semana 2 el título fue de 1/3200; de forma similar, los ratones inmunizados con OMV's de *C. freundii* tuvieron el título 1/6400 en la semana 6 y 2 [Figura 12].

Estos resultados indican que las OMV's de ambas especies de *Citrobacter* son capaces de inducir una respuesta humoral específica, con un incremento notable del título de anticuerpos tras la inmunización, con valores notablemente más altos en ambas cepas en la semana 6.



**Figura 12. Títulos de anticuerpos Anti-OMV's de *Citrobacter* spp. generados durante el esquema de inmunización en el modelo murino.** (A) Título de Anti-OMV's totales de *C. amalonaticus*. (B) Título de Anti-OMV's totales de *C. freundii*. La línea punteada (- - -) representa el criterio de corte o positividad. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes, y las barras de error representan el error estándar de la media. Elaboración propia

#### 7.4. Isotipificación de anti-OMV's totales

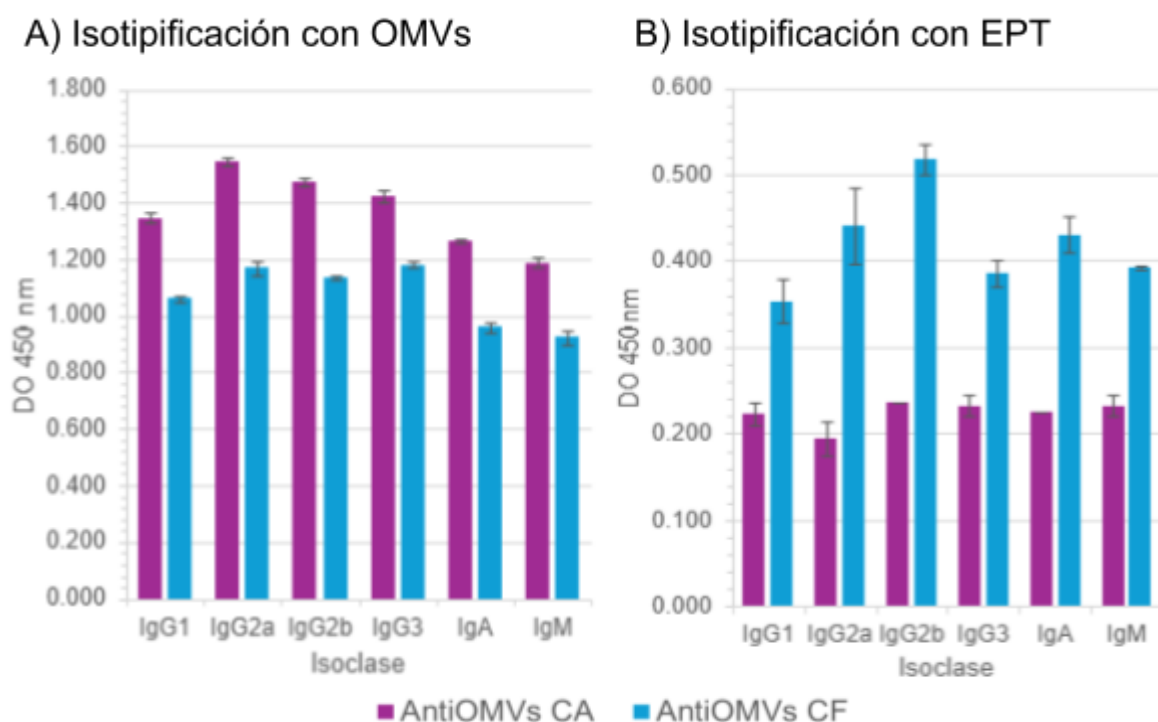
Los ensayos de isotipificación de anticuerpos se realizaron con los sueros hiperinmunes obtenidos al final del esquema de inmunización con las microvesículas secretadas por ambas especies. Tras corregir los valores de absorbancia restando el blanco, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para confirmar la distribución normal de los datos y realizar una ANOVA de tres vías [Tabla 5].

Este análisis mostró diferencias significativas entre los isotipos de inmunoglobulinas ( $F(5,36)=54.60$ ,  $p<0.0001$ ), entre los anticuerpos evaluados (anti-OMV's Ca vs anti-OMV's Cf) ( $F(1,36)=52.94$ ,  $p<0.0001$ ), y entre los antígenos de unión (OMV vs extracto proteico) ( $F(1,36)=15574$ ,  $p<0.0001$ ). Esta última variable fue relevante, ya que los perfiles isotópicos fueron más definidos y de mayor magnitud al interactuar con OMV's íntegras en comparación con los extractos proteicos obtenidos del tratamiento con RIPA (EPT). Por ejemplo, en IgG1 con el suero anti-OMV's Ca se observó una diferencia significativa en la respuesta con OMV's y con EPT (mean diff = 1.117, 95% CI 1.019–1.215,  $p < 0.0001$ ), un comportamiento similar se aprecia en la mayoría de las comparaciones múltiples.

Asimismo, se observaron interacciones significativas entre isotipo  $\times$  inmunógeno ( $p<0.0001$ ), inmunógeno  $\times$  bacteria ( $p<0.0001$ ) y la triple interacción ( $p=0.0088$ ). Estos resultados indican que la respuesta de cada isotipo depende *tanto* del tipo de antígeno *como* del suero hiperinmune utilizado. La única interacción no significativa fue isotipo  $\times$  bacteria ( $p=0.5218$ ), lo que sugiere que ambas especies inducen un perfil isotópico similar pero de distinta magnitud.

El análisis post-hoc de Tukey [Anexo 9] mostró que las OMV's inducen mayores títulos de IgG2a, IgG2b e IgG3. Para *C. amalonaticus* se observó un predominio de IgG2a, sin diferencia significativa con IgG2b ( $p=0.2159$ ,  $DO>1.4$ ), mientras que en *C. freundii* los valores de IgG3, IgG2a e IgG2b fueron comparables (hasta  $DO\approx 1.18$ ). Por su parte, en la interacción con epítomos en los extractos proteicos totales se observó una disminución general en la reactividad, con perfiles isotópicos menos definidos y valores de DO menores en *C. amalonaticus* respecto a *C. freundii*. En el suero anti-OMV's Ca no se detectaron diferencias significativas entre isotipos ( $p>0.9999$ ), y en el suero anti-OMV's Cf predominó IgG2a, aunque sin diferencia estadística con IgG2b ( $p=0.4648$ ).

En general, estos resultados sugieren que los epítomos inmunodominantes están mayormente asociados a la conformación nativa de las OMV's. Además, el tipo y magnitud de la respuesta Th inducida depende tanto del antígeno como del suero hiperinmune utilizado.



**Figura 13. Isotipificación de los anticuerpos obtenidos en el suero hiperinmune con diferentes antígenos de unión.** (A) Isotipos al utilizar OMV's como antígeno en el ensayo de ELISA. (B) Isotipos con extractos proteicos bacterianos como antígeno blanco. Las barras representan la media  $\pm$  la SEM. Elaboración propia.

**Tabla 5. ANOVA de tres vías: inmunógeno, especie, inmunoglobulina.** Elaboración propia.

|                            | Suma de cuadrados (SC) | Grados de libertad (gl) | Cuadrado medio (CM) | Valor F (DFn, DFd) | Valor de p |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|------------|
| Isotipo de Ig              | 0,2044                 | 5                       | 0,04088             | F (5, 36) = 54.60  | P<0.0001   |
| Inmunógeno (OMV vs EXP)    | 11,66                  | 1                       | 11,66               | F (1, 36) = 15574  | P<0.0001   |
| Bacteria (CA vs CF)        | 0,03963                | 1                       | 0,03963             | F (1, 36) = 52.94  | P<0.0001   |
| Isotipo de Ig x Inmunógeno | 0,159                  | 5                       | 0,0318              | F (5, 36) = 42.48  | P<0.0001   |
| Isotipo de Ig x Bacteria   | 0,003193               | 5                       | 0,0006385           | F (5, 36) = 0.8529 | P=0.5218   |

|                                       |         |    |           |                   |          |
|---------------------------------------|---------|----|-----------|-------------------|----------|
| Inmunógeno x Bacteria                 | 0,8913  | 1  | 0,8913    | F (1, 36) = 1191  | P<0.0001 |
| Isotipo de Ig x Inmunógeno x Bacteria | 0,03311 | 5  | 0,006621  | F (5, 36) = 8.845 | P<0.0001 |
| Residual                              | 0,02695 | 36 | 0,0007486 |                   |          |

Nota. "Bacteria" en realidad hace referencia al tipo de anticuerpo empleado, anti-OMV's de *C. amalonaticus* o anti-OMV's de *C. freundii*.

## 7.5. Especificidad de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica permite observar la interacción de un anticuerpo con antígenos inmunogénicos específicos mediante un segundo anticuerpo acoplado a FITC y observando a través de un microscopio de epifluorescencia.

Los anticuerpos policlonales utilizados se produjeron a través de un modelo murino inmunizado con OMV's sin tratar, lo que permitió visualizar células bacterianas y microvesículas, previamente bloqueadas con BSA, al anclarse a componentes de membrana compartidas por ambas estructuras. En la fila superior de la Figura 14 se aprecian con una excitación fluorescente intensa las células de *C. amalonaticus* y en un menor tamaño señaladas con una flecha las OMV's secretadas por la misma especie; en las imágenes de la parte inferior se observa el mismo efecto para la muestra de *C. freundii*.

En la primera columna, se muestran los ensayos con OMV's purificadas de ambas especies, en los cuales se observan estructuras esféricas de diferente diámetro debido a la tendencia de las vesículas a aglomerarse entre ellas.

A su vez, en la última columna, las muestras permeabilizadas con tritón al 0.05% se logró identificar el DNA dentro de algunas unidades gracias a la unión del colorante de contraste DAPI con los ácidos nucleicos; algunas bacterias presentan cambios en su morfología a una estructura más redonda o una lisis total posterior al tratamiento.

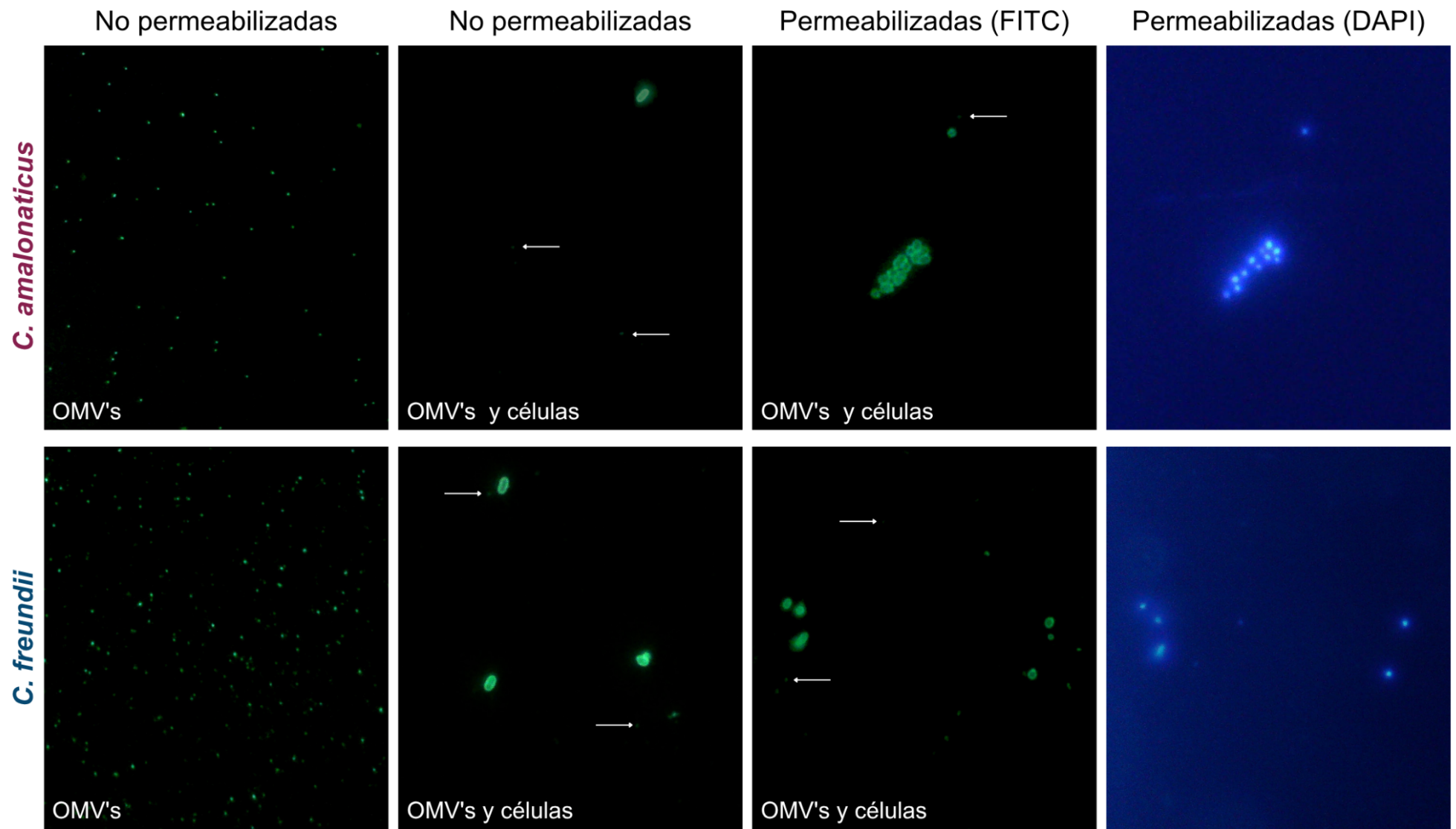


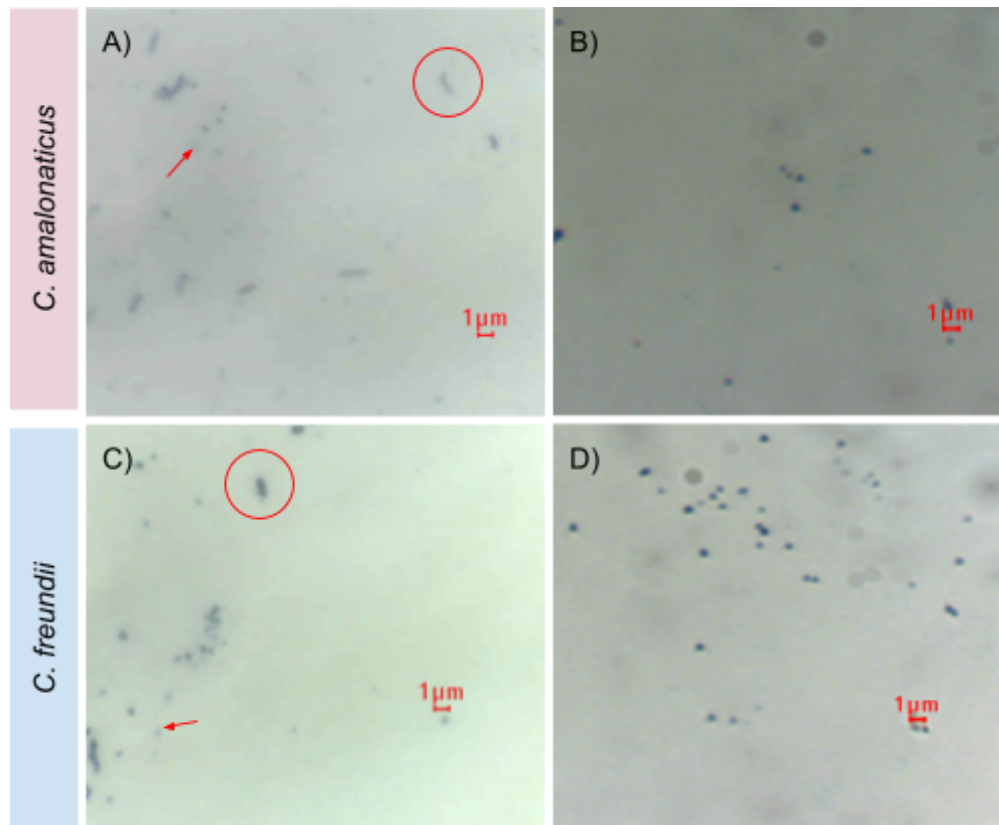
Figura 14. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta de *Citrobacter spp.* y sus OMV's. Elaboración propia.

## 7.6. Especificidad de anticuerpos mediante inmunomarcaje con fosfatasa alcalina

Con el objetivo de reafirmar visualmente que los anticuerpos anti-OMV's reconocen antígenos de superficie de *Citrobacter*, se realizó un inmunomarcaje utilizando un segundo anticuerpo diferente al ensayo anterior, esta vez acoplado a fosfatasa alcalina.

En las imágenes que corresponden a muestras con bacterias y microvesículas, Figura 15 [A y C] se observaron células bacilares >1  $\mu\text{m}$  (círculos rojos) y aglomerados esféricos significativamente más pequeños cerca de ellas, OMV's (flechas rojas). Estas estructuras presentaron un color azul-violeta, por la actividad enzimática del BCIP con el anticuerpo secundario.

En las imágenes B y D, OMV's purificadas, también se vio una tinción puntual en la misma coloración, mostrando partículas esféricas de distinto tamaño pero menores a 1  $\mu\text{m}$ . Por lo que los anticuerpos generados en el biomodelo reconocen componentes asociados tanto a vesículas como a la superficie bacteriana



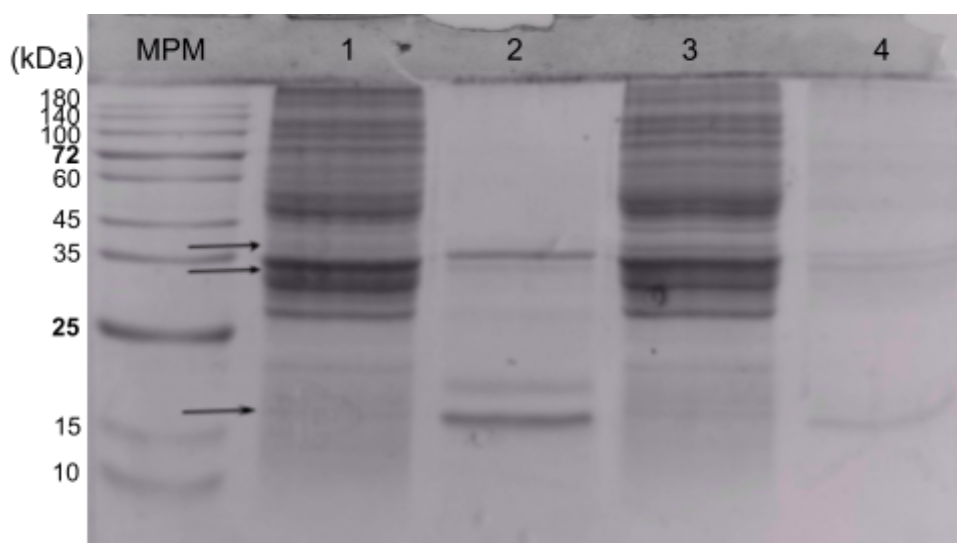
**Figura 15. Inmunomarcaje de *Citrobacter* spp. y sus OMV's con anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.** Muestras con bacterias y OMV's de *C. amalonaticus* (A) y *C. freundii* (C), respectivamente. Se observan estructuras bacilares teñidas (círculos rojos) y OMV's <1 µm (flechas rojas). (B, D) Muestra de OMV's purificadas de las respectivas cepas. Elaboración propia.

### 7.7. SDS-PAGE. Perfiles proteicos de extractos bacterianos y extractos de OMV's

Usando un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se comparó el perfil proteico de las vesículas de membrana y los extractos proteicos totales de *C. freundii* y *C. amalonaticus* [Figura 16]. Como era de esperar, el extracto proteico total (carriles 1 y 3) mostró una complejidad notablemente mayor en la cantidad de bandas y rango de masas moleculares en comparación con el perfil de las OMV's (carril 2 y 4).

Los extractos proteicos totales de ambas especies presentan un patrón de bandas similar, con pesos moleculares desde los ~17 kDa hasta los ~200 kDa, con una mayor expresión de proteínas entre los 25-60 kDa. Por su parte, el perfil de las vesículas fue distinto entre ambas especies, con una cantidad de bandas menor y patrones particulares compartidos con su cepa progenitora.

Por último, se aprecian bandas en común en los cuatro carriles a los ~38, 33 y 17 kDa aproximadamente, las cuales coinciden con el peso molecular de proteínas de membrana externa como OmpA, OmpC, OmpX y OmpF.



**Figura 16. Migración electroforética de las proteínas bacterianas y OMV's (SDS-PAGE).** (MPM)

Marcador de peso molecular; (carril 1) 20 µg de extractos proteicos totales de *C. amalonaticus*; (carril 2) 20 µg de OMV's secretadas por *C. amalonaticus*; (carril 3) 20 µg de extractos totales de *C. freundii*; (carril 4) 20 µg de OMV's de *C. freundii* tratadas.

**Tabla 6. Probable perfil proteico de *Citrobacter* spp. y sus OMV's en función de su peso molecular.** Elaboración propia.

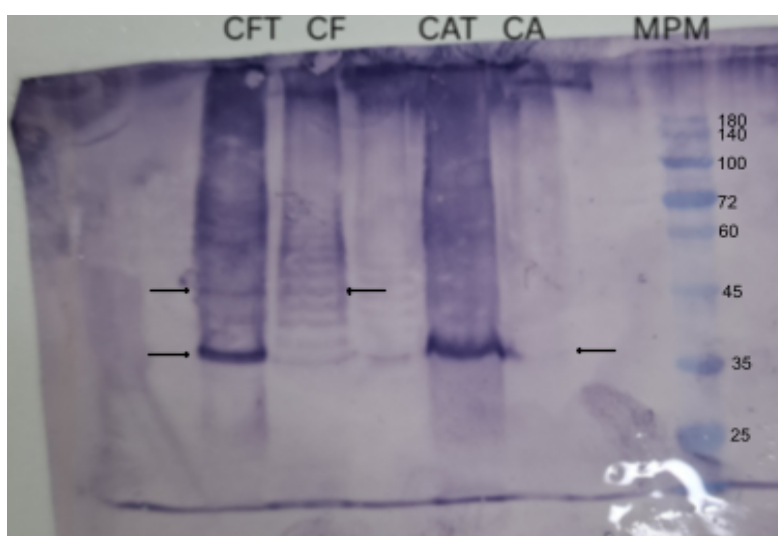
| No. | UniProt ID | Peso Molecular (kDa) | Posible proteína identificada | Función Principal                    |
|-----|------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 1   | A0AA40NE31 | 15.00 - 18.77        | Sub proteínas ribosomales     | Ribosoma / Citoplasma                |
| 2   | A0A2S4RZC0 | 18.435               | OmpX                          | Adhesina / Membrana Externa          |
| 3   | A0A0D7M0T5 | 21.53 - 23,54        | OmpW                          | Porina / Membrana Externa            |
| 4   | P24016     | 30.03 - 37.00        | OmpA                          | Estructura Membrana Externa          |
| 5   | A0A2S4RVF0 | 34.18 - 39.00        | OmpC                          | Porina Mayor / Membrana Externa      |
| 6   | A0A8I0SUV1 | 38.6 - 40.16         | OmpF                          | Porina Mayor / Membrana Externa      |
| 7   | A0A2S4RTS1 | 38.14                | LamB                          | Porina Específica (Maltosa)          |
| 8   | A0A9C7QLL6 | 53 - 55              | Tol C                         | Canal de expulsión/ Membrana externa |
| 9   | A0A7G2IH31 | 65.62                | LptD                          | Biosíntesis LPS / Membrana Externa   |
| 10  | A0AAE7GXA7 | 43.25 - 44.99        | EF-Tu                         | Factor de Elongación Tu / Citoplasma |
| 11  | A0A2S4RUB3 | 53.02 - 57.57        | GroEL                         | Chaperona / Citoplasma               |

## 7.8. Identificación de proteínas potencialmente inmunogénicos mediante Western blot

Para el ensayo de detección de proteínas específicas se migró un gel de SDS-PAGE con 40 µg de cada uno de los extractos proteicos obtenidos. Posteriormente, las proteínas transferidas a la membrana fueron incubadas con

anticuerpos policlonales anti-OMV's de ambas cepas, los cuales reconocieron proteínas específicas de las muestras. A continuación, se aplicó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, y los sitios de unión antígeno-anticuerpo se revelaron mediante la reacción cromogénica con BCIP/NBT

La afinidad de los anticuerpos anti-OMV's con las proteínas inmunogénicas presentes en la célula bacteriana de origen y las OMV's secretadas, permitió observar una misma banda con peso molecular entre ~35 kDa y ~38 kDa. En particular, los extractos de *C. freundii* coincidieron en una segunda banda a los ~47 kDa [Figura 17].



**Figura 17. Western blot de los extractos totales bacterianos y OMV's.** (CFT) 40 µg de extractos proteicos totales de *C. freundii*; (CF) 40 µg de OMV's secretadas por *C. freundii*; (CAT) 40 µg de extractos totales de *C. amalonaticus*; (CA) 40 µg de OMV's de *C. amalonaticus*; (MPM) Marcador de peso molecular.

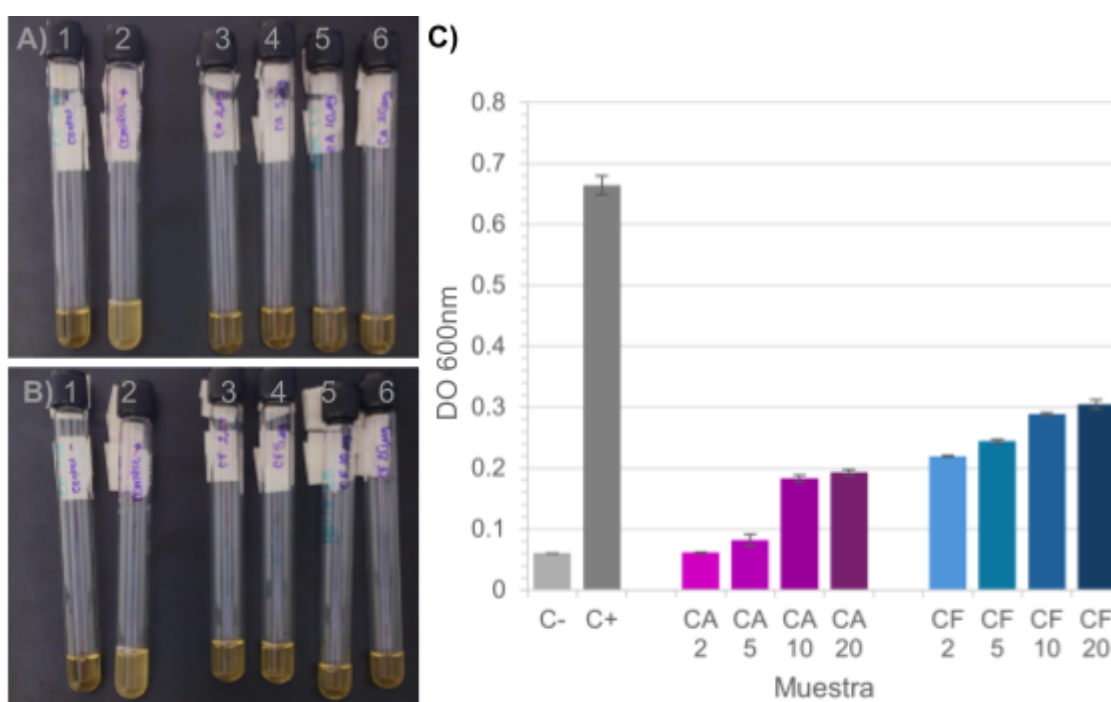
### 7.9. Ensayo de protección y transferencia genética a cepa susceptible a AM

En el ensayo se utilizaron tubos con medio LB adicionado con ampicilina y diferentes concentraciones de microvesículas, y posteriormente se inoculó con una cepa de *E. coli* sensible a este antibiótico. Esto con la intención de evaluar la capacidad protectora conferida por las vesículas y su potencial en la transferencia de genes interespecie.

Transcurridas 48 horas se comparó la absorbancia de cada muestra a 600 nm. El control negativo, mostró una baja absorbancia ( $DO_{600} = 0.06$ ), indicando inhibición total del crecimiento bacteriano en contraste con el control positivo ( $DO_{600} \approx 0.66$ ).

En ambos ensayos, se observó un incremento progresivo en la turbidez conforme aumentó la concentración de vesículas. Particularmente, las muestras CA 2 y CA 5, que corresponden a las menores concentraciones de OMV's de *C. amalonaticus*, tuvieron una  $DO_{600}$  similar al control negativo lo que sugiere una protección baja o nula de *E. coli*, mientras que CA 10 y CA 20 alcanzaron valores cercanos a 0.18-0.2.

Las muestras tratadas con microvesículas de *C. freundii* (CF) mostraron un efecto protector más evidente ante la ampicilina desde la concentración más baja y un aumento gradual en la absorbancia, desde CF 2 ( $DO_{600} \approx 0.22$ ) hasta CF 20 ( $DO_{600} \approx 0.3$ ).



**Figura 18. Ensayo de protección a AM y transferencia genética en *E. coli* DH5-α por OMV's.**

(A) Ensayo con OMV's de *C. amalonaticus*; (1) Control negativo, (2) Control positivo, (3) 2 µg de OMV's, (4) 5 µg, (5) 10 µg, (6) 20 µg.

(B) Ensayo con OMV's de *C. freundii*; (1) Control negativo, (2) Control positivo, (3) 2 µg de OMV's, (4) 5 µg, (5) 10 µg, (6) 20 µg.

(C) Absorbancia correspondiente al crecimiento de *E. coli* DH5-α tras el ensayo de protección y transferencia. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 experimentos independientes. Elaboración propia.

### 7.10. Prueba de susceptibilidad a antibióticos por sensidiscos (antibiogramas)

El ensayo de protección a ampicilina mediante OMV's del género *Citrobacter* resultó en el crecimiento de una cepa de *E. coli DH5α* con fenotipo resistente. Por ello, se realizó una prueba con sensidiscos para evaluar *in vitro* el perfil de resistencia adquirido frente a diferentes antimicrobianos y compararlo con el de las cepas secretoras de OMV's [Tabla 7].

Con este estudio se pueden obtener resultados cualitativos sobre el fenotipo de la bacteria indicando la sensibilidad a un antibiótico en función del diámetro del halo de inhibición que se forma alrededor de los sensidiscos. Cabe mencionar que las cepas se pueden categorizar como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) acorde a los valores preestablecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute.

**Tabla 7. Perfil de resistencia de *Citrobacter* spp. y *E. coli* transformada mediante OMV's utilizando sensidiscos.** Las cepas de *Citrobacter* mostraron un fenotipo heterogéneo de resistencia, evidenciado por el crecimiento de colonias dentro del halo de inhibición (H\*). Elaboración propia.

| Antibiótico | <i>C. amalonaticus</i> | <i>C. amalonaticus</i><br>Heteroresistente | <i>E. coli</i><br>transformada con<br>10 µg de<br>CA-OMVs | <i>E. coli</i><br>transformada con<br>20 µg de<br>CA-OMVs | <i>C. freundii</i> | <i>C. freundii</i><br>Heteroresistente | <i>E. coli</i><br>transformada con<br>10 µg de CF-OMVs | <i>E. coli</i><br>transformada con<br>20 µg de CF-OMVs |
|-------------|------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| AK          | S                      | S                                          | S                                                         | S                                                         | S                  | S                                      | S                                                      | S                                                      |
| AM          | R                      | R                                          | R                                                         | R                                                         | R                  | R                                      | R                                                      | R                                                      |
| CF          | R                      | R                                          | R                                                         | R                                                         | R                  | R                                      | R                                                      | R                                                      |
| CFX         | H*                     | R                                          | R                                                         | R                                                         | H*                 | R                                      | R                                                      | R                                                      |
| CTX         | H*                     | S                                          | S                                                         | S                                                         | H*                 | S                                      | S                                                      | S                                                      |
| CL          | H*                     | R                                          | R                                                         | R                                                         | I                  | I                                      | R                                                      | R                                                      |
| DC          | R                      | R                                          | R                                                         | R                                                         | R                  | R                                      | R                                                      | R                                                      |
| GE          | H*                     | S                                          | S                                                         | S                                                         | S                  | S                                      | S                                                      | S                                                      |
| NET         | H*                     | S                                          | S                                                         | S                                                         | S                  | S                                      | S                                                      | S                                                      |
| NF          | H*                     | I                                          | R                                                         | R                                                         | I                  | I                                      | R                                                      | R                                                      |
| PE          | R                      | R                                          | R                                                         | R                                                         | R                  | R                                      | R                                                      | R                                                      |
| SXT         | H*                     | S                                          | S                                                         | S                                                         | S                  | S                                      | S                                                      | S                                                      |
| CB          | R                      | R                                          | R                                                         | R                                                         | R                  | R                                      | R                                                      | R                                                      |
| CPF         | S                      | S                                          | S                                                         | S                                                         | S                  | S                                      | S                                                      | S                                                      |
| NOF         | S                      | S                                          | S                                                         | S                                                         | S                  | S                                      | S                                                      | S                                                      |

En las placas para ambas especies de *Citrobacter* se observó un perfil heterogéneo de resistencia a Cefotaxima (CFX, 30 µg) y Ceftriaxona (CTX, 30 µg); además, *C. amalonaticus* presentó el mismo comportamiento ante Cloranfenicol (CL, 30 µg), Gentamicina (GE, 10 µg), Netilmicina (NET, 30 µg), Nitrofurantoína (NF, 300 µg) y Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT, 25 µg). Por lo que se tomaron colonias aisladas y se realizó la prueba de susceptibilidad priorizando una mayor distancia entre los antibióticos con la finalidad de reducir la interferencia entre ellos, y se midieron los halos de inhibición nuevamente.

Por su parte, las células de *E. coli* transformadas mediante OMV's adquirieron un fenotipo similar a la cepa original, destacando una resistencia mayor a cloranfenicol y nitrofurantoína.

## 8. Discusión

*Citrobacter* es un género de bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, con forma recta y alargada, y suelen medir entre 0.8 y 3 µm de longitud (Brenner & Farmer, 2005). En la Figura 9, mediante una **tinción diferencial**, se observan bacilos Gram negativos con coloración rosada y diámetro  $\geq 1$  µm, correspondientes a esta bacteria. Además, se identifican estructuras esféricas de menos de 1 µm con una tonalidad levemente violeta, atribuidas a vesículas secretadas durante su crecimiento.

Por su parte, las OMV's son partículas esféricas, nano y micrométricas, derivadas de la membrana externa de las bacterias, cuya secreción implica un costo energético elevado y suele inducirse en condiciones de estrés, como escasez de nutrientes, variaciones de temperatura o presencia de antibióticos (Mancini et al., 2020). El primer reporte de secreción de vesículas data de 1965, al observar sobrenadantes libres de células en cultivos de *E. coli* en condiciones restrictivas de lisina (Bishop & Work, 1965). Por ello, se evidencia una menor cantidad de OMV's en condiciones estándar en la Figura 9, en comparación con la Figura 10, donde la exposición a ampicilina y el tiempo de incubación promovió la hipervesiculación.

El protocolo empleado para la obtención de OMV's, mediante centrifugación y filtración, se ha documentado previamente en otras especies como *E. coli*, *Moraxella*

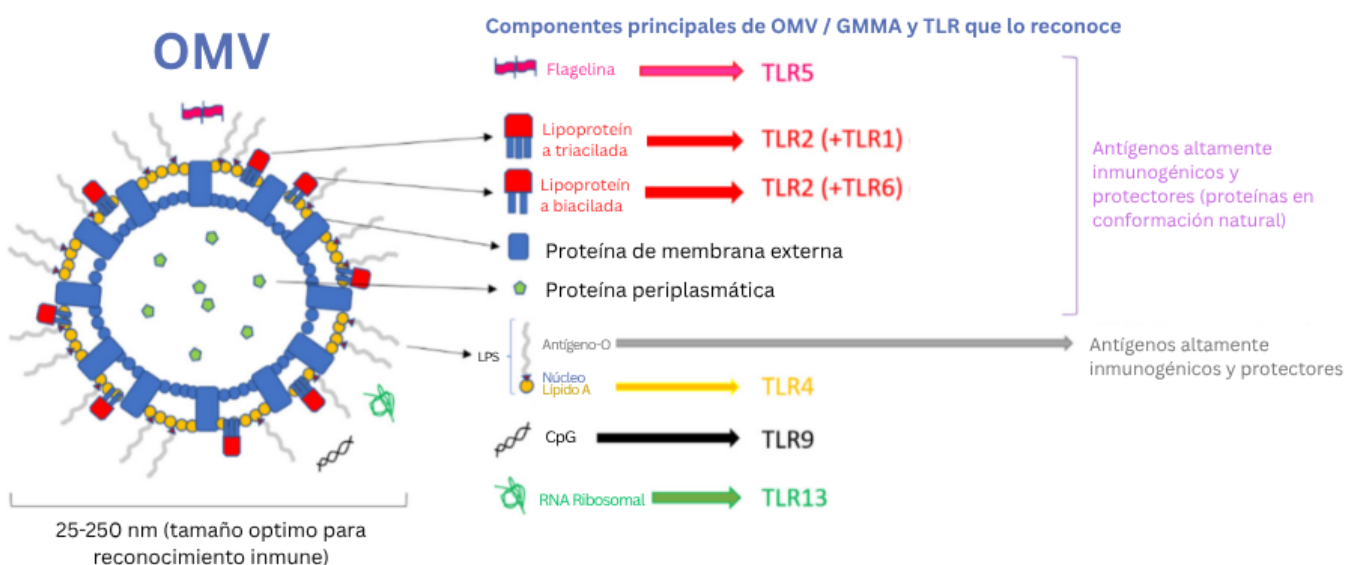
*catarrhalis* y *Klebsiella pneumoniae* (Li et al., 2024; Schaar et al., 2011; Li et al., 2025). En la Figura 11 se confirma la correcta purificación y morfología característica de las OMV's de *Citrobacter*, la cual corresponde a estructuras esféricas uniformes con un diámetro inferior a 1  $\mu$ m. Para una caracterización más completa, podrían emplearse técnicas como microscopía electrónica de transmisión (TEM ó Cryo-TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) o análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Pérez-Cruz et al, 2015; Delgado et al., 2029; Liu et al., 2023).

Gracias a sus dimensiones y a la presencia de antígenos bacterianos en su superficie, estas vesículas pueden ser reconocidas y captadas fácilmente por células inmunitarias, lo que les confiere capacidad adyuvante intrínseca que favorece la respuesta humoral y celular (Pschunder et al., 2024; Prior et al., 2021; Mancini et al., 2020; Findlow et al., 2010); por ejemplo, las microvesículas de *Bordetella pseudomallei* inducen una respuesta más robusta que bacterias inactivadas por calor o atenuadas vivas (Prior et al, 2021). Además, Espinosa (2024) demostró que la inmunización con OMV's de *K. pneumonie* (KpBUAP021) en combinación con un adyuvante genera títulos de anticuerpos con DO dos veces mayor que la obtenida solo con OMV's.

Con base en estas propiedades, se evaluó el **potencial inmunogénico** de las OMV's de *C. freundii* y *C. amalonaticus* en el modelo murino BALB/c. Se administró una mezcla volumétrica 1:1 de microvesículas y adyuvante TiterMax Gold, alcanzando títulos de anticuerpos de 1:6400 en ambas cepas y un aumento progresivo en la concentración de inmunoglobulinas durante el esquema de inmunización [Figura 12]. Cabe destacar que las OMV's de *C. freundii* alcanzaron dicho título desde la segunda semana, mientras que las de *C. amalonaticus* lo lograron sólo al final del esquema. Esta diferencia podría atribuirse a variaciones en la composición proteica [Figura 16] y lipídica de las OMV's secretadas por cada especie, lo cual influye en su capacidad de estimular células inmunitarias y en la eficiencia de presentación de antígenos (Furuyama y Sircili, 2021; Kuo et al., 2022).

Entre los componentes más inmunogénicos presentes en las OMV's destacan el lipopolisacárido (LPS), diversas porinas de membrana y lipoproteínas (Lieberman, 2022, Tan et al., 2018); estos actúan como agonistas naturales de receptores de reconocimiento de patrones, particularmente TLR2, TLR4 y TLR9 [Figura 19]. En

consecuencia, la obtención de anticuerpos policlonales anti-OMV's indica un reconocimiento efectivo de dichos antígenos por células presentadoras e inmunitarias. Posteriormente, los antígenos son procesados y expuestos en forma de péptidos en el contexto MHC-II, estimulando células CD4+ y promoviendo la diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, cuyo isotipo depende de la vía de señalización implicada (Croia et al., 2023, Juodeikis & Carding, 2022).



**Figura 19. Componentes inmunogénicos de las OMV's y su interacción con los receptores tipo Toll.** Adaptado de Mancini et al, 2020.

En el ensayo de isotipificación [Figura 13] y prueba de ANOVA se concluyó que la respuesta de cada isotipo depende *tanto* del tipo de antígeno *como* del suero hiperinmune utilizado, siendo el tipo de antígeno el factor más determinante.

Con el análisis post-hoc de Tukey [Anexo 9], se observó que la interacción con **OMV's** de los anticuerpos anti-OMVCa genera una respuesta predominante a IgG2a e IgG2b, mientras que el suero anti-OMV Cf dió resultados estadísticamente similares de IgG2a, IgG2b e IgG3. En modelos murinos, los isotipos IgG2a e IgG3 se asocian a respuesta celulares, opsonización, inflamación aguda y activación de la vía clásica del complemento (Abbas et al., 2018; Snapper & Paul, 1987; Alaniz et al., 2007; Bonnington & Kuehn, 2014; Delves, 2024; Michaelsen et al., 2004; Snapper & Mond, 1993). En conjunto, este perfil sugiere una respuesta Th1 dependiente de

IFN- $\gamma$ , potencialmente acompañada de componentes inflamatorios asociados a Th17 (IgG2b).

La inducción de respuestas **Th1** por OMV's ha sido documentada en otras bacterias Gram negativas como *Vibrio cholerae* y *A. baumannii* (Schild et al., 2008; Huang et al., 2019). Ello se atribuye a la presencia de PAMPs en su membrana, LPS, porinas y lipoproteínas, que son eficientemente procesados por células presentadoras de antígenos y promueven la secreción de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$ .

En contraste, la reactividad frente a los antígenos del **extracto proteico bacteriano** se redujo notablemente ( $F(1,36)=15574$ ,  $p<0.0001$ ). El suero anti-OMVCa tuvo inmunogenicidad diferencial baja y anti-OMVCf coincide en la tendencia a IgG2a y IgG2b sin diferencia significativa entre ambos isotipos. Esto sugiere que la conformación nativa tridimensional de las OMV's favorece la exposición multivalente de componente inmunogénicos, lo que incrementa la respuesta inmune, mientras que los extractos proteicos tratados con RIPA presentan epítomos menos accesibles o parcialmente desnaturalizados. Esta pérdida de la estructura podría reducir la activación de receptores de reconocimiento de patrones y explicar la menor reactividad.

Para evidenciar de manera visual que los anti-OMV's obtenidos del biomodelo reconocen señales específicas tanto en la superficie bacteriana como en las microvesículas, se realizaron ensayos de **inmunofluorescencia indirecta** [Figura 14]. El reconocimiento por parte de los anticuerpos no sólo es relevante por su capacidad de defensa mediante opsonización (Hadadi et al., 2021; Howlander et al., 2018), sino que también la administración conjunta de anti-OMV's con antibióticos aumenta la susceptibilidad bacteriana a ciertos fármacos (Huang et al., 2019; Cai et al., 2018).

En los ensayos con bacterias y microvesículas permeabilizadas, se observa marcaje verde fluorescente uniforme alrededor de la membrana celular, acompañado de la tinción de DNA con DAPI. La variación en el tamaño de OMV's purificadas ya ha sido previamente documentada mediante microscopía electrónica de transmisión (Jiang et al., 2022; Juárez, 2023); esta tendencia a agruparse podría estar asociada a proteínas de membrana, como PagC, que a pH 6 actúa como adhesina

promoviendo la agregación de microvesículas de *Salmonella typhimurium* y la formación de biopelículas (Wood et al., 2025).

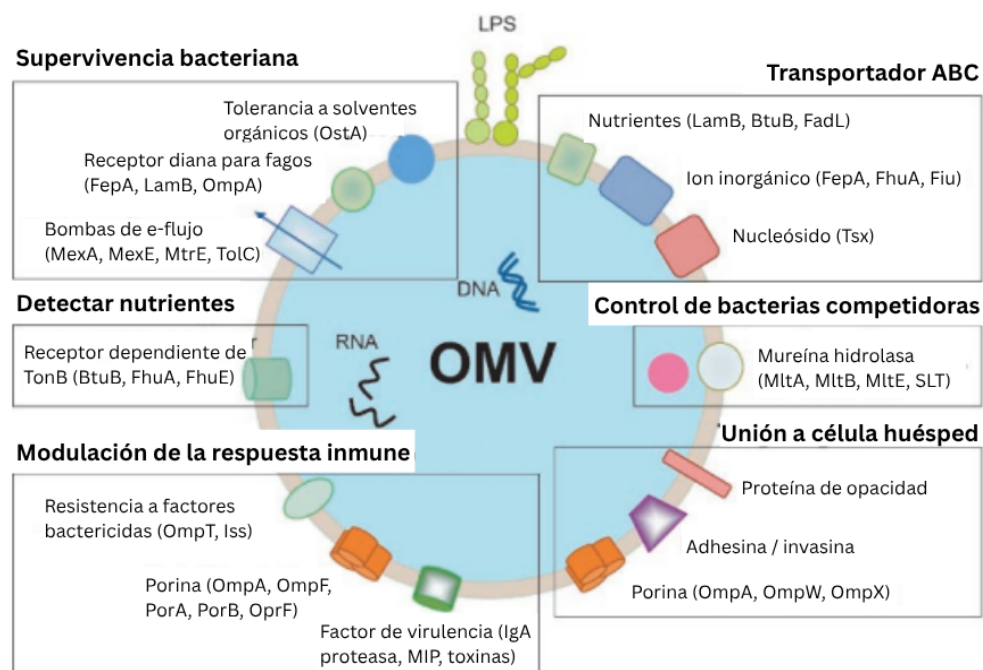
Complementariamente, en la Figura 15 se presenta una variante del ensayo de **inmunodetección**, adaptada de los protocolos de inmunocitoquímicas (ICQ) de Harlow y Lane (1988). El objetivo fue reafirmar este reconocimiento a antígenos de membrana, por lo que se realizó un inmunomarcaje utilizando un segundo anticuerpo diferente al ensayo de IFI, esta vez acoplado a fosfatasa alcalina. La reacción con el sustrato BCIP/NBT generó una coloración azul-púrpura que marcó la membrana de bacterias y OMV's reconocidas originalmente por el anti-OMV's (Harlow & Lane, 1988; Cartun & Kryzer, 1997).

En conjunto, estas pruebas demostraron un marcaje uniforme tanto en bacterias como microvesículas por parte de los anticuerpos policlonales, confirmando que los epítomos se preservan durante el proceso de vesiculación, probablemente asociados a proteínas de membrana (OMPs) o LPS. Para identificar las proteínas, se obtuvo y comparó mediante **SDS-PAGE** el perfil proteico de las bacterias y de las OMV's secretadas.

El patrón de bandeo de las microvesículas mostró similitud con el de su especie progenitora, además de algunas diferencias entre las OMV's de ambas especies. Esto se debe a que la composición molecular de las microvesículas es dinámica y está influenciada por las condiciones de cultivo y la especie secretora, priorizando la incorporación de OMPs, proteínas periplasmáticas y lípidos específicos, mientras se excluyen otros compuestos (Salinas, 2025; Ruiz-Palma et al., 2021; Bauman et al., 2006 ).

La Tabla 6 resume las posibles proteínas observadas en el gel de poliacrilamida, las cuales han sido reportadas también por otros autores en OMV's de bacterias Gram negativas. La proteína TolC se ha descrito en microvesículas de *Salmonella* (Guerra-Peña et al., 2021) y *E. coli* (Lee et al., 2007; Berlanda-Scorza et al., 2007); OmpA, OmpC y OmpF en *E. coli* (Velimirov, 2024; Lee et al., 2007; Berlanda-Scorza et al., 2007); la maltoporina LamB en *P. antarctica* NF (Nevot et al., 2006) y *E. coli* (Lee et al., 2007; Berlanda-Scorza et al., 2007); el factor de elongación EF-Tu en *N. meningitidis* (Post et al., 2005) y *E. coli* (Lee et al., 2007; Berlanda-Scorza et al.,

2007); y la chaperonina GroEL en *N. meningitidis* Δgna33 (Ferrari et al., 2006) y *E. coli* (Lee et al., 2007; Berlanda-Scorza et al., 2007).

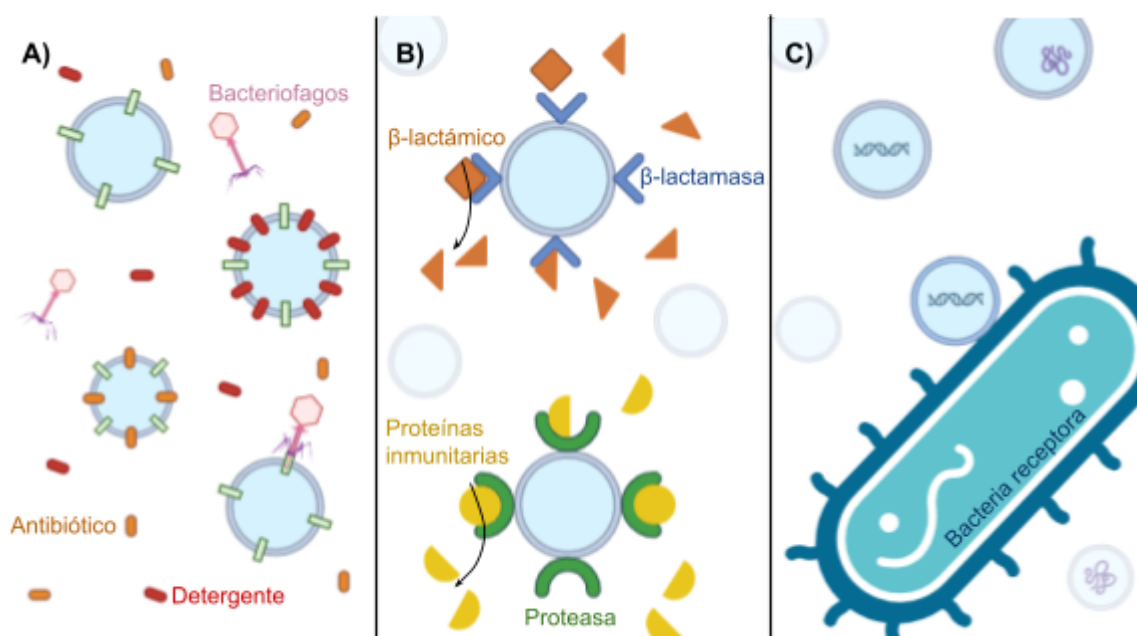


**Figura 20. Funciones fisiológicas y patológicas propuestas de las principales proteínas de membrana en OMV's de bacterias Gram negativas.** Adaptado de Eun-Young et al., 2008.

En el ensayo de detección de proteínas inmunogénicas mediante **Western blot** [Figura 17], los extractos mostraron interacciones inespecíficas en pesos moleculares altos y un par de antígenos conservados en los menores, los cuales corresponden a los epítopes marcados en las IFIs e ICQs. El bandeo compartido alrededor de los 37 kDa podría sugerir la presencia de proteínas de membrana, como OmpA (35–38 kDa), una de las proteínas más abundantes en bacterias y en OMV's (Lee et al., 2008; Bielaszewska et al., 2017). Esto es importante, ya que OmpA participa en la estabilidad de la envoltura, evasión inmune y tiene capacidad adhesina por lo que está implicada en la invasión celular (Velimirov, 2024; Sun et al., 2024; Confer & Ayalew, 2020). Por otro lado, la inmunorreactividad observada cerca de ~47 kDa en *C. freundii* podría corresponder a porinas como OmpC y OmpF, ambas asociadas a la permeabilidad y virulencia en enterobacterias (Belousov et al., 2023).

Además de su capacidad inmunomoduladora, las OMV's tienen un papel importante en la HGT y la **protección frente a la acción de los antibióticos**. Estas estructuras actúan como señuelos de unión, favorecen la hidrólisis de compuestos antimicrobianos, e incluso participan en la transferencia horizontal de genes y/o proteínas de resistencia, tanto intra e interespecie [Figura 21]. La inactivación enzimática de antibióticos mediada por OMV's ha sido reportada en especies como *P. aeruginosa* (Ciofu et al., 2000; Kadurugamuwa et al., 1995), *K. pneumoniae* (Zhang et al., 2023; Yao et al., 2023) y *E. coli* (Li et al., 2025).

Particularmente, las microvesículas de *C. freundii* y *C. amalonaticus* de este estudio, poseen actividad hidrolítica por  $\beta$ -lactamasas, lo que reduce de manera significativa la concentración de ampicilina en el medio y favorece la proliferación de cepas susceptibles (Leyva, s/f; Juárez, 2023). Por ello, en la Figura 18, se observa una correlación directa entre la concentración de OMV's y la absorbancia de los cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Este comportamiento ha sido previamente documentado en ensayos con *L. adecarboxylata*, *Pectobacterium zantedeschia* y *P. odoriferum* (Castolo, 2023; Jonca et al., 2021).



**Figura 21. Protección a antibióticos medidas por OMV's.** (A) Actuando como señuelos de unión. (B) Mediante “breakdown” o inactivación por enzimas hidrolíticas/degradativas en su membrana. (C) Transferencia horizontal de genes de resistencia intraespecie e interespecie. Elaboración propia.

Finalmente, las muestras de *E. coli* que crecieron durante el ensayo de protección, fueron recuperadas y evaluadas mediante **antibiogramas** [Tabla 7]. Los resultados evidenciaron que las microvesículas de *Citrobacter* son capaces de transferir determinantes de resistencia antibiótica interespecie. Esto coincide con estudios que destacan el papel de las OMV's como vehículos de transferencia génica en diversas especies; por ejemplo, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* y *Riemerella anatipestifer* (Espiga et al., 2023; Weng et al., 2023; Johnston et al., 2023; Wang et al., 2025)

Particularmente, las OMV's de *E. coli* O157:H7 pueden transferir exitosamente genes de virulencia (stx1, stx2) y las de *E. coli* O104:H4 plásmidos pESBL con betalactamasas (blaCTX-M-15, blaTEM-1) a otras cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, y otras enterobacterias, confiriendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Collins & Brown, 2021; Bielaszewska et al., 2020). De manera similar, las vesículas secretadas por *K. pneumoniae*, tienen un papel en la transferencia de genes *blaNDM-1*, *prmpA* y *iroB*, aumentando la Concentración Mínima Inhibitoria a la mayoría de los antibióticos evaluados en las cepas receptoras (Espiga et al., 2023; Hua et al., 2022).

La resistencia a cloranfenicol y nitrofurantoína incrementada en las *E. coli* transformadas es particularmente relevante, dado que la cepa donadora se caracteriza fenotípicamente con sensibilidad intermedia a dicho antibiótico. Esto podría sugerir el encapsulamiento de genes crípticos que se expresan en un nuevo contexto genético (Dell'Annunziata et al., 2021; Liu et al., 2022), transferencia directa de proteínas o enzimas asociadas a resistencia con un fenotipo transitorio (Dell'Annunziata et al., 2021; Rumbo et al., 2011), o co-transferencia de elementos genéticos móviles con múltiples genes de resistencia (Bielaszewska et al., 2017; Bitto et al., 2017). Respecto al último mecanismo, *Citrobacter* alberga plásmidos e integrones (Phuadraksa et al., 2023; Li et al., 2020) que podrían contener, por ejemplo, el gen *cat* con un bajo nivel de transcripción, resultando en un fenotipo sensible o intermedio en el organismo original (Partridge et al., 2018; Blair et al., 2015; Stokes & Gillings, 2011).

Además, los antibiogramas de *C. amalonaticus*, recuperadas de criovial, exhibieron un fenotipo de heterorresistencia (H\*) a varios antibióticos, caracterizado por el

crecimiento de colonias dentro de los halos de inhibición [Anexo #,#], fenómeno descrito en *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *A. baumannii* y *H. pylori*, entre otras. Este fenotipo puede explicarse por la coexistencia de dos subpoblaciones con diferentes niveles de resistencia o, alternativamente, por la supervivencia de una fracción residual de la población frente a un antimicrobiano bactericida, definido como aquel capaz de eliminar  $\geq 99,9$  % del inóculo inicial (Martínez, 2008).

## 9. Conclusiones

Las OMV's de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus* poseen una dualidad funcional: promueven la resistencia bacteriana por enzimas hidrolíticas en su membrana y genes de resistencia asociados a su cargo; además, tienen la capacidad de inducir la respuesta inmune celular gracias a las OMP y LPS que las conforman.

Su aplicación como vehículo vacunal o farmacológico requiere equilibrar su potencial citotóxico e inmunogénica. Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-OMV's podrían conferir protección mediante la activación del complemento, inhibición de la adherencia bacteriana o aumentando su sensibilidad a antibióticos específicos.

## 10. Perspectivas / líneas de trabajo a futuro

- Identificar las proteínas inmunogénicas contenidas en la membrana de las OMV's mediante proteómica y electroforesis de 2D.
- Aislar el cargo de OMV's de *Citrobacter* spp. para determinar la presencia de plásmidos o DNA lineal codificantes para enzimas modificadoras de antibióticos mediante la técnica de PCR.
- Realizar un ensayo de perfil de citocinas para validar el sesgo de la respuesta inmune sugerido.

- En las cepas transformadas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , amplificar los genes correspondientes al fenotipo resistente, no solo a betalactamasas, mediante PCR.
- Evaluar si se presenta algún daño metabólico o histológico por la exposición constante a OMV's de *Citrobacter* en los tejidos obtenidos de los biomodelos.
- Evaluar si en condiciones fisiológicas y exposición a antibióticos las bacterias del grupo ESKAPE adquieren un fenotipo con nuevas resistencias mediado por OMV's.
- En las cepas transformadas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , evaluar si la exposición a OMV's influyó en su formación de biopelículas promoviendo mecanismos de resistencia alternos.

## 11. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos

|          |     |                                                                    |
|----------|-----|--------------------------------------------------------------------|
| °C       | ... | Grados Celsius                                                     |
| AM       | ... | Ampicilina                                                         |
| BCIP/NBT | ... | Sustrato de fosfatasa alcalina (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) |
| BHI      | ... | <i>Brain Heart Infusion</i> (Infusión Cerebro Corazón)             |
| bla      | ... | Genes de resistencia a betalactamasas                              |
| BLEE     | ... | Betalactamasas de espectro extendido                               |
| BSA      | ... | Albúmina de suero bovino                                           |
| CFX      | ... | Cefotaxima                                                         |
| CL       | ... | Cloranfenicol                                                      |
| CTX      | ... | Ceftriaxona                                                        |
| DAPI     | ... | 4',6-diamidino-2-fenilindol                                        |
| DC       | ... | Dicloxacilina                                                      |
| CTX      | ... | Ceftriaxona                                                        |
| DAPI     | ... | 4',6-diamidino-2-fenilindol                                        |
| DC       | ... | Dicloxacilina                                                      |
| EDTA     | ... | Ácido etilendiaminotetraacético                                    |

|             |     |                                              |
|-------------|-----|----------------------------------------------|
| FITC        | ... | Fluoresceína-5-isotiocianato                 |
| g           | ... | Gramos                                       |
| GE          | ... | Gentamicina                                  |
| h           | ... | Horas                                        |
| IFI         | ... | Inmunofluorescencia indirecta                |
| ITU         | ... | Infecciones de Tracto Urinario               |
| LB          | ... | Luria-Bertani                                |
| LPS         | ... | Lipopolisacárido                             |
| M           | ... | Molar                                        |
| MCE         | ... | Ésteres de celulosa mixtos                   |
| mg          | ... | Miligramos                                   |
| min         | ... | Minutos                                      |
| ml / mL     | ... | Mililitro                                    |
| mM          | ... | Milimolar                                    |
| MPM         | ... | Marcador de Peso Molecular                   |
| MV          | ... | Vesícula de membrana                         |
| NET         | ... | Netilmicina                                  |
| NF          | ... | Nitrofurantoína                              |
| nm          | ... | Nanómetros                                   |
| OM          | ... | Outer membrane / Membrana externa            |
| OMV's / VME | ... | Microvesículas de Membrana Externa           |
| PAMPs       | ... | Patrones moleculares asociados a patógenos   |
| PBS         | ... | Buffer Salino de Fosfatos                    |
| PFA         | ... | Persulfato de amonio                         |
| PG          | ... | Peptidoglicano                               |
| RIPA        | ... | <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> |
| rpm         | ... | Revoluciones por minuto                      |
| SDS         | ... | Dodecil sulfato de sodio                     |
| spp         | ... | Especies                                     |
| SXT         | ... | Sulfametoxazol/Trimetoprim                   |
| TA          | ... | Temperatura ambiente                         |
| TAE         | ... | Tris-Acetate-EDTA                            |

|     |     |                                                        |
|-----|-----|--------------------------------------------------------|
| TMB | ... | Sustrato de peroxidasa (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina) |
| µg  | ... | Microgramos                                            |
| µl  | ... | Microlitros                                            |

## 12. Bibliografía

1. Abbas, K., Lichtman, A. and Pillai, S. (2018) *Cellular and Molecular Immunology*. 9th Edition, Elsevier, Amsterdam, 4, 57-93.
2. Abdi S.N., Ghotaslou R., Ganbarov K., Mobed A., Tanomand A., Yousefi M., Asgharzadeh M., Kafil H.S. *Acinetobacter baumannii Efflux Pumps and Antibiotic Resistance*. *Infect. Drug Resist.* 2020;13:423–434. doi: 10.2147/IDR.S228089.
3. Aguirre-Sánchez, J. R., Quiñones, B., Ortiz-Muñoz, J. A., Prieto-Alvarado, R., Vega-López, I. F., Martínez-Urtaza, J., Lee, B. G., & Chaidez, C. (2023). Comparative Genomic Analyses of Virulence and Antimicrobial Resistance in *Citrobacter werkmanii*, an Emerging Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, 11(8), 2114. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082114>
4. 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. *Journal of Immunology*, 179(11), 7692–7701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7692>
5. Angarita-Merchán M, Filippo-Iriarte G, Mora-Moreno DP, Ferrebuz-Cardozo AJ. (2024) Efecto del bloqueo de bombas de eflujo en el tratamiento antimicrobiano en cepas con multirresistencia tipo BLEE de origen clínico en Boyacá, Colombia. *MÉD.UIS.*;37(1):9-24. DOI: <https://doi.org/10.18273/revmed.v37n1-2024001>
6. Arens S., Verbist L. (1997). Diferenciación y susceptibilidad de los aislamientos de *Citrobacter* de pacientes en un hospital universitario. *Clin. Microbiol. Infect.* 3 53–57. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00251.x>
7. Aschtgen, M. S., Lynch, J. B., Koc, E., Schwartzman, J., McFall-Ngai, M., and Ruby, E. (2016). Rotation of *Vibrio fischeri* flagella produces outer membrane vesicles that induce host development. *J. Bacteriol.* 198, 2156–2165. doi: 10.1128/JB.00101-16
8. Baker S.M., Settles E.W., Davitt C., Gellings P., Kikendall N., Hoffmann J., Wang Y., Bitoun J., Lodrigue K.R., Sahl J.W. et al. (2021) *Burkholderia Pseudomallei* OMV's Derived from Infection Mimicking Conditions Elicit Similar Protection to a Live-Attenuated Vaccine. *npj Vaccines*;6:18. doi: 10.1038/s41541-021-00281-z.
9. Bauman SJ, Kuehn MJ. (2006) Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect* 8:2400–2408
10. Belley, A., Morrissey, I., Hawser, S., Kothari, N., Knechtle, P. (2021). Third-generation cephalosporin resistance in clinical isolates of *Enterobacterales* collected between 2016-2018 from USA and Europe: genotypic analysis of  $\beta$ -lactamases and comparative in vitro activity of cefepime/enmetazobactam. *Journal of global antimicrobial resistance*, 25:93-101. doi: 10.1016/J.JGAR.2021.02.031
11. Belousov, M. V., Kosolapova, A. O., Fayoud, H., Sulatsky, M. I., Sulatskaya, A. I., Romanenko, M. N., Bobylev, A. G., Antonets, K. S., & Nizhnikov, A. A. (2023). OmpC and OmpF Outer Membrane Proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Form Bona Fide Amyloids. *International journal of molecular sciences*, 24(21), 15522. <https://doi.org/10.3390/ijms242115522>

12. Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M. J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A. R., Serino, L., Gomes Moriel, D., Nesta, B., Fontana, M. R., Spagnuolo, A., Pizza, M., Norais, N., & Grandi, G. (2008). Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* DeltatolR IHE3034 mutant. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 7(3), 473–485. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700295-MCP200>
13. Bielaszewska, M., Daniel, O., Karch, H., & Mellmann, A. (2020). Dissemination of the blaCTX-M-15 gene among Enterobacteriaceae via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(9), 2442–2451. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa214>
14. Bielaszewska, M., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Jarosch, K. A., Steil, D., Zhang, W., He, X., Lloubes, R., Fruth, A., Karch, H., & Dobrindt, U. (2017). Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of *Escherichia coli* O104:H4. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02441>
15. Bishop, D. G., & Work, E. (1965). An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *The Biochemical journal*, 96(2), 567–576. <https://doi.org/10.1042/bj0960567>
16. Bitto, N. J., Chapman, R., Pidot, S., Costin, A., Lo, C., Choi, J., D'Cruze, T., Reynolds, E. C., Dashper, S. G., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Stinear, T. P., Stacey, K. J., & Ferrero, R. L. (2017). Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Scientific reports*, 7(1), 7072. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07288-4>
17. Bjune, G., Høiby, E. A., Grønnesby, J. K., Arnesen, Ø., Fredriksen, J. H., Halstensen, A., & Frøholm, L. O. (1991). Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *The Lancet*, 338(8775), 1093–1096. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91961-S](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91961-S)
18. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
19. Blakely, G. W. (2024). Mechanisms of horizontal gene transfer and DNA recombination (pp. 309–324). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818619-0.00043-5>
20. Bonnington, K., Kuehn, M. (2014) Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta: Mol Cell Res.* Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913004382>
21. Bottero, D., Gaillard, M. E., Zurita, E., Moreno, G., Martinez, D. S., Bartel, E., Bravo, S., Carriquiriborde, F., Errea, A., Castuma, C., Rumbo, M., & Hozbor, D. (2016). Characterization of the immune response induced by pertussis OMV's-based vaccine. *Vaccine*, 34(28), 3303–3309. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.079>
22. Brenner, D. J., & Farmer, J. J. III. (2005). Enterobacteriaceae: *Citrobacter*. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, & G. M. Garrity (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2.<sup>a</sup> ed., Vol. 2). Springer.
23. Cai, W., Kesavan, D. K., Wan, J., Abdelaziz, M. H., Su, Z., & Xu, H. (2018). Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based. *Diagnostic pathology*, 13, 1–12.
24. Camacho-Silvas L. A. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual [Bacterial resistance, a current crisis.]. *Revista española de salud pública*, 97, e202302013.
25. Castolo Arellano, G. (2023). Identificación de proteínas inmunogénicas asociadas a microvesículas e involucradas en la patogenicidad de *Leclercia adecarboxylata*. [Tesis de licenciatura] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/19633>

26. Charpentier, L. A., Dolben, E. F., Hendricks, M. R., Hogan, D. A., Bomberger, J. M., & Stanton, B. A. (2023). Bacterial Outer Membrane Vesicles and Immune Modulation of the Host. *Membranes*, 13(9), 752. <https://doi.org/10.3390/membranes13090752>
27. Chenhaka, L. H., Van Wyk, D. A. B., Mienie, C., Bezuidenhout, C. C., & Lekota, K. E. (2023). The phylogenomic landscape of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Citrobacter* species isolated from surface water. *BMC genomics*, 24(1), 755. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09867-4>
28. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
29. Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2000). Chromosomal  $\beta$ -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 9-13. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.9>
30. Collins, S. M., & Brown, A. C. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles as Antibiotic Delivery Vehicles. *Frontiers in immunology*, 12, 733064. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733064>
31. Confer, A. W., & Ayalew, S. (2020). The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 611–631.
32. Croia, L., Boscato Sopetto, G., Zanella, I., Caproni, E., Gagliardi, A., Tamburini, S., & Grandi, G. (2023). Immunogenicity of *Escherichia coli* Outer Membrane Vesicles: Elucidation of Humoral Responses against OMV-Associated Antigens. *Membranes*, 13 (11), 882.
33. Davis J.M., Carvalho H.M., Rasmussen S.B., O'Brien A.D.(2006) Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1 Delivered by Outer Membrane Vesicles of Uropathogenic *Escherichia coli* Attenuates Polymorphonuclear Leukocyte Antimicrobial Activity and Chemotaxis. *Infect. Immun.* 2006;74:4401. doi: 10.1128/IAI.00637-06.
34. Delgado, L., Baeza, N., Pérez-Cruz, C., López-Iglesias, C., & Mercade, E. (2019). Cryo-transmission Electron Microscopy of Outer-inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-negative Pathogenic Bacteria. *BIO-PROTOCOL*, 9(18). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3367>
35. Dell'Annunziata, F., Dell'Aversana, C., Della Pepa, M. E., Boccia, G., De Filippis, A., Di Onofrio, V., Passariello, C., & Fiorentino, G. (2021). Gene transfer potential of outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5985. <https://doi.org/10.3390/ijms22115985>
36. Dell'Annunziata, F., Dell'Aversana, C., Doti, N., Donadio, G., Dal Piaz, F., Izzo, V., De Filippis, A., Galdiero, M., Altucci, L., Boccia, G., Galdiero, M., Folliero, V., & Franci, G. (2021). Outer Membrane Vesicles Derived from *Klebsiella pneumoniae* Are a Driving Force for Horizontal Gene Transfer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8732. <https://doi.org/10.3390/ijms22168732>
37. Delves, P. J. (2024). Sistema del complemento. *Manual Merck Versión Para Profesionales; Manuales Merck*.  
<https://www.merckmanuals.com/es-us/professional/inmunolog%C3%ADa-y-trastornos-al%C3%A9rgicos/biolog%C3%ADa-del-sistema-inmunitario/sistema-del-complemento>
38. Dhital, S., Deo, P., Stuart, I., & Naderer, T. (2021). Bacterial outer membrane vesicles and host cell death signaling. *Trends in microbiology*, 29(12), 1106–1116. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.04.003>
39. Doran T. I. (1999). The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: review. *Clin. Infect. Dis.* 28, 384–394. 10.1086/515106
40. Espiga, B., Yang, A., Liu P., Wang, Z., Jian, Z., (2023). Las vesículas de membrana externa que transmiten bla NDM-1 median la aparición de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta resistente a carbapenémicos. *Antimicrob Agents Chemother* 67:e01444-22.<https://doi.org/10.1128/aac.01444-22>

41. Espinosa Hernández, S. (2024). Caracterización inmunológica de OMV's purificadas de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. [Tesis de maestría] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/24850>
42. Eun-Young, L., Dong-Sic, C., Kwang-Pyo, K., & Yong, S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *MassSpectrometry Reviews*. doi.org/10.1002/mas.20175
43. Faccone D., Albornoz E., Tijet N., Biondi E., Gomez S., Pasterán F. et al. (2019). Characterization of a multidrug resistant *Citrobacter amalonaticus* clinical isolate harboring blaNDM-1 and mcr-1.5 genes. *Infect. Genet. Evol.* 67, 51–54. doi: 10.1016/j.meegid.2018.10.020
44. Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR, Biolchi A, Brunelli B, Giuliani MM, Pizza M, Norais N, Grandi G. (2006). Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* Dgna33 mutant: Proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics* 6:1856–1866.
45. Findlow J, Borrow R, Snape MD, Dawson T, Holland A, John TM et al. (2010) Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant Meningococcal serogroup B vaccine with and without outer membrane vesicles, administered in infancy. *Clin Infect Dis.* 51:1127–37. doi: 10.1086/656741
46. Fonton, P., Hassoun-Kheir, N., & Harbarth, S. (2024). Epidemiology of *Citrobacter* spp. infections among hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*, 24(1), 662. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09575-8>
47. Furuya, E. & Lowy, F. (2006) Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 4, 36–45 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>
48. Furuyama, N., & Sircili, M. P. (2021). Outer membrane vesicles (OMV's) produced by gram-negative bacteria: structure, functions, biogenesis, and vaccine application. *BioMed Research International*, 2021(1), 1490732.
49. Guerra-Peña, Y., Remedios-Jiménez, L., Izquierdo-Fiallo, K., Gonzales-Aznar, E., Fajardo-Sánchez, A., Fernández-Castillo, S., García-Rivera, D., & Pérez-Quintero, J. L. (2021). Reactividad de sueros de ratones inmunizados con vesículas de membrana externa derivadas de *Salmonella* entérica. *VacciMonitor*, 30(1), 33-38.
50. Hadadi-Fishani, M., Najar-Peerayeh, S. Siadat, S., Sekhavati, M., & Mobarez, A. (2021) Isolation and immunogenicity of extracted outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* under antibiotics treatment conditions. *Iranian Journal of Microbiology*, 13 (6), p. 824.
51. Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Cell staining. Antibodies: a laboratory manual* (pp. 364–393). Cold Spring Harbor Laboratory.
52. Howlader, D., Koley, H., Sinha, R., Bhaumik, U., Mukherjee, P., & Dutta, S. (2018) Development of a novel *s. typhi* and *Paratyphi A* outer membrane vesicles based bivalent vaccine against enteric fever. *PLoS One*, 13 (9), e0203631.
53. Hua, Y.; Wang, J.; Huang, M.; Huang, Y.; Zhang, R.; Bu, F.; Yang, B.; Chen, J.; Lin, X.; Hu, X.; et al. (2022) Outer Membrane Vesicles-Transmitted Virulence Genes Mediate the Emergence of New Antimicrobial-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg. Microbes Infect.*, 11, 1281–1292.
54. Huang, W., Zhang, Q., Li, W., Chen, Y., Shu, C., Li, Q., Zhou, J., Ye, C., Bai, H., Sun, W., Yang, X., & Ma, Y. (2019). Anti-outer Membrane Vesicle Antibodies Increase Antibiotic Sensitivity of Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01379>

55. Jabeen, K., Farooqi, J., Irfan, S., Hasan, R., & Mehar, S. (2023). *Citrobacter amalonaticus*: An emerging cause of bloodstream infections in immunocompromised patients. *Journal of Infection and Public Health*, 16(1), 145-149.
56. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2021). The changing face of the family Enterobacteriaceae (Order: "Enterobacterales"): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), 10-1128.
57. Jiang, X., Chu, C., Wang, Z., Gu, J., Hong, Y., Li, Q., & Jiao, X. (2022). Preclinical evaluation of OMV's as potential vaccine candidates against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 1037607. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1037607>
58. Jindal, S. & Agarwal, K. (2023) *Consociatio vita minabatur procursus*': *Citrobacter freundii* outbreak causing periculosus neonatal septicaemia in neonatal intensive care unit of tertiary care hospital. *Journal of Patient Safety and Infection Control* 11(1):p 8-14, Jan–Apr 2023. | DOI: 10.4103/jpsic.jpsic\_16\_23
59. Jindal, S., & Agarwal, K. (2022). 'Consociatio vita minabatur procursus': *Citrobacter freundii* outbreak causing periculosus neonatal septicaemia in neonatal intensive care unit of tertiary care hospital. *Journal of Patient Safety and Infection Control*, doi: 10.4103/jpsic.jpsic\_16\_23
60. Johnston, E. L., Zavan, L., Bitto, N. J., Petrovski, S., Hill, A. F., & Kaparakis-Liaskos, M. (2023). Planktonic and Biofilm-Derived *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles Facilitate Horizontal Gene Transfer of Plasmid DNA. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.05179-22>
61. Jonca, J., Waleron, M., Czaplewska, P., Bogucka, A., Steć, A., Dziomba, S., Jasiecki, J., Rychłowski, M., & Waleron, K. (2021). Membrane Vesicles of *Pectobacterium* as an Effective Protein Secretion System. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12574. <https://doi.org/10.3390/ijms222212574>
62. Juárez, A. (2023). Purificación de OMV's de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus*: determinación del cargo molecular asociado a la resistencia a antibióticos. [Tesis de licenciatura] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/20274>
63. Juodeikis, R., & Carding, S. R. (2022). Outer Membrane Vesicles: Biogenesis, Functions, and Issues. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 86(4), e0003222. <https://doi.org/10.1128/membr.00032-22>
64. Kadurugamuwa, J.L.; Beveridge, T.J. (1995) Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: A novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177, 3998–4008.
65. Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and characterization of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 170, 1–9.
66. 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. et al. (2016) A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through SRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005672. doi: 10.1371/journal.ppat.1005672.
67. Kohl, P., Zingl, F. G., Eichmann, T. O., & Schild, S. (2018). Isolation of Outer Membrane Vesicles Including Their Quantitative and Qualitative Analyses. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1839, 117–134. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8685-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8685-9_11)
68. Kulkarni, HM, Swamy, CV y Jagannadham, MV (2014). La caracterización molecular y el análisis funcional de las vesículas de la membrana externa de la bacteria antártica *Pseudomonas syringae*

- sugieren una posible respuesta a las condiciones ambientales. *J. Proteome Res.* 13, 1345–1358. doi: 10.1021/pr4009223
69. Kumar, P., Meghvansi, M. K., & Kamboj, D. V. (2021). Phenotypic Characterization and Whole-Genome Analysis of a Novel Bacteriophage HCF1 Infecting *Citrobacter amalonaticus* and *C. freundii*. *Frontiers in microbiology*, 12, 644013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.644013>
  70. Kuo, I-Ying., Hsieh, C., Kuo, W.-T., Chang, C., & Wang, Y. (2022). Recent advances in conventional and unconventional vesicular secretion pathways in the tumor microenvironment. *Journal of Biomedical Science*, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00837-8>
  71. Lee EY, Bang JY, Park GW, Choi DS, Kang JS, Kim HJ, Park KS, Lee JO, Kim YK, Kwon KH, Kim KP, Gho YS. (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics* 7:3143–3153.
  72. Lee M.K., Armstrong D.A., Hazlett H.F., Dessaint J.A., Mellinger D.L., Aridgides D.S., Christensen B.C., Ashare A. (2021) Exposure to Extracellular Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Result in Loss of DNA Methylation at Enhancer and DNase Hypersensitive Site Regions in Lung Macrophages. *Epigenetics*. 2021;16:1187. doi: 10.1080/15592294.2020.1853318.
  73. Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2008). Proteomics in Gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(6), 535–555.
  74. Li, L., Xu, X., Cheng, P., Yu, Z., Li, M., Yu, Z., Cheng, W., Zhang, W., Sun, H., & Song, X. (2025). *Klebsiella pneumoniae* derived outer membrane vesicles mediated bacterial virulence, antibiotic resistance, host immune responses and clinical applications. *Virulence*, 16(1), 2449722. <https://doi.org/10.1080/21505594.2025.2449722>
  75. Li, N., Wu, M., Wang, L., Tang, M., Xin, H., & Deng, K. (2024). Efficient Isolation of Outer Membrane Vesicles (OMV's) Secreted by Gram-Negative Bacteria via a Novel Gradient Filtration Method. *Membranes*, 14(6), 135. <https://doi.org/10.3390/membranes14060135>
  76. Li, Z., Lin, Y., Lu, L., Wang, K., Yang, L., Li, P., Li, J., Jia, L., Li, P., & Song, H. (2020). Genetic characterisation of a complex class 1 integron in an NDM-1-producing *Citrobacter freundii* ST396 clinical strain isolated from a urine sample. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 64–66. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.002>
  77. Liao YT, Kuo SC, Chiang MH, Lee YT, Sung WC, Chen YH, Chen TL, Fung CP (2015) La OXA-58 extracelular de *Acinetobacter baumannii* se libera de forma primaria y selectiva a través de vesículas de membrana externa después de la translocación periplásmica dependiente de Sec. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015;59:7346–7354. doi: 10.1128/AAC.01343-15.
  78. Lieberman L. (2022) Outer membrane vesicles: A bacterial-derived vaccination system. *Front. Microbiol.* 13:1029146. doi: 10.3389/fmicb.2022.1029146
  79. Liu, H., Wu, C., Chen, D., Li, R., Xu, J., & Zhang, S. (2022). Comparative genomics analysis and outer membrane vesicle-mediated horizontal antibiotic-resistance gene transfer in *Avibacterium paragallinarum*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 946365. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.946365>
  80. Liu, L., Oi, C., Nie, Q., Pham, H. Q., Ma, H., Zhang, L., Ho, P. L., & Lau, T. C.-K. (2023). Comparative analysis of outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli* reveal the role of aromatic amino acids synthesis proteins in motility. *International Journal of Medical Microbiology*, 313(1), 151573–151573. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2023.151573>
  81. Liu, L., Qin, L., Hao, S., Lan, R., Xu, B., Guo, Y., Jiang, R., Sun, H., Chen, X., Lv, X., Xu, J., & Zhao, C. (2020). Lineage, Antimicrobial Resistance and Virulence of *Citrobacter* spp. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(3), 195. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030195>

82. Liu, L., Zhang, L., Zhou, H., Yuan, M., Hu, D., Wang, Y., Sun, H., Xu, J., & Lan, R. (2021). Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Citrobacter* spp. Causing Extraintestinal Infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 737636. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.737636>
83. López, C., Ayala, J. A., Bonomo, R. A., González, L. J., & Vila, A. J. (2019). Protein determinants of dissemination and host specificity of metallo- $\beta$ -lactamases. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11615-w>
84. Ma, J., Xu, R., Li, W., Liu, M., & Ding, X. (2024). Whole-genome sequencing of clinical isolates of *Citrobacter Europaeus* in China carrying blaOXA-48 and blaNDM-1. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 23(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00699-y>
85. Mancini, F., Rossi, O., Necchi, F., & Micoli, F. (2020). OMV Vaccines and the Role of TLR Agonists in Immune Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4416. <https://doi.org/10.3390/ijms21124416>
86. Manganello, S., Tayara, A., Perazzi, B., Neira, L., Famiglietti, A., Pugliese, L., Santini S. & Vay C. (2001). Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario. *Enferm Infec Microbiol Clin* 19(1), 11-14. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(01\)72541-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(01)72541-4)
87. Marinacci, B., Krzyżek, P., Pellegrini, B., Turacchio, G., & Grande, R. (2023). Latest Update on Outer Membrane Vesicles and Their Role in Horizontal Gene Transfer: A Mini-Review. *Membranes*, 13(11), 860. <https://doi.org/10.3390/membranes13110860>
88. Martinez-Martinez, L. (2008). Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 26(8), 481-484. [10.1016/S0213-005X\(08\)72774-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(08)72774-5)
89. Michaelsen, T. E., Kolberg, J., Aase, A., Herstad, T. K., & Høiby, E. A. (2004). The four mouse IgG isotypes differ extensively in bactericidal and opsonophagocytic activity when reacting with the P1.16 epitope on the outer membrane PorA protein of *Neisseria meningitidis*. *Scandinavian journal of immunology*, 59(1), 34–39. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01362.x>
90. Micoli, F., Adamo, R., & Nakakana, U. (2024). Outer membrane vesicle vaccine platforms. *BioDrugs*, 38(1), 47–59. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00627-0>
91. Mohanty, S., Sharma, M., & Sood, S. (2007). *Citrobacter* infections in a tertiary care hospital in Northern India. *Journal of Infection*, 54(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.07.002>
92. Naddaf, M. (2024). 40 million deaths by 2050: toll of drug-resistant infections to rise by 70%. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-024-03033-w>
93. Nevot M, Deroncelle V, Messner P, Guinea J, Mercade E. (2006). Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas antarctica* NF3. *Environ Microbiol* 8:1523–1533.
94. Organización Mundial de la Salud, OMS. (2024). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>
95. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-1>
96. Pepperell, C., Kus, J. V., Gardam, M. A., Humar, A., & Burrows, L. L. (2002). Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), 3555–3560. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3555-3560.2002>
97. Pérez-Cruz, C., Delgado, L., López-Iglesias, C., Mercade E (2015) Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *PLoS ONE* 10(1): e0116896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116896>

98. Petousis-Harris H. (2018). Impact of meningococcal group B OMV vaccines, beyond their brief. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 14(5), 1058–1063. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1381810>
99. Phuadraksa, T., Wichit, S., Songtawee, N., Tantimavanich, S., Isarankura-Na-Ayudhya, C., & Yainoy, S. (2023). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance *mcr-3.5* gene in *Citrobacter amalonaticus* and *Citrobacter sedlakii* isolated from healthy individual in Thailand. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1067572>
100. Plakkal N, Soraisham AS, Amin H. (2013) *Citrobacter freundii* brain abscess in a preterm infant: a case report and literature review. *Pediatr Neonatol*; 54:137-140. DOI: 10.1016/j.pedneo.2012.10.004.
101. Post DM, Zhang D, Eastvold JS, Teghanemt A, Gibson BW, Weiss JP. (2005). Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Biol Chem* 280:38383–38394.
102. Prior, J. T., Davitt, C., Kurtz, J., Gellings, P., McLachlan, J. B., & Morici, L. A. (2021). Bacterial-Derived Outer Membrane Vesicles are Potent Adjuvants that Drive Humoral and Cellular Immune Responses. *Pharmaceutics*, 13(2), 131. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020131>
103. Pschunder, B., Locati, L., López, O., Martin Aispuro, P., Zurita, E., Stuible, M., Durocher, Y., & Hozbor, D. (2024). Outer membrane vesicles derived from *Bordetella pertussis* are potent adjuvant that drive Th1-biased response. *Frontiers in immunology*, 15, 1387534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1387534>
104. Ramsamy, Y., Misana, K. P., Amoako, D. G., Allam, M., Ismail, A., Singh, R., Abia, A. L. K., & Essack, S. Y. (2020). Pathogenomic Analysis of a Novel Extensively Drug-Resistant *Citrobacter freundii* Isolate Carrying a *bla*NDM-1 Carbapenemase in South Africa. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(2), 89. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020089>
105. Ruiz-Palma, S. M. D., Ávila-Calderón, E. D., Aguilera-Areola, M. G., López-Merino, A., Ruiz, E. A., Morales-García, M. D. R., López-Villegas, E. O., Gómez-Lunar, Z., Arellano-Reynoso, B., & Contreras-Rodríguez, A. (2021). Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* and *Brucella neotomae*. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1611–1626. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02170-w>
106. Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., Mosquera, A., Chaves, F., & Bou, G. (2011). Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3084–3090. <https://doi.org/10.1128/aac.00929-10>
107. Salinas Jiménez, A. (2025) Evaluación inmunológica de anticuerpos anti-OMV's de *Leclercia adecarboxylata*. [Tesis de licenciatura] Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
108. Sarshar M., Scribano D., Palamara A.T., Ambrosi C., Masotti A. (2022) The *Acinetobacter baumannii* model can explain the role of small non-coding RNAs as potential mediators of host-pathogen interactions. *Front. Mol. Biosci.* 2022;9:1088783. doi: 10.3389/fmolb.2022.1088783.
109. Schaar, V., Nordström, T., Mörgelin, M., & Riesbeck, K. (2011). *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry  $\beta$ -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8), 3845–3853. <https://doi.org/10.1128/AAC.01772-10>
110. Schild, S., Nelson, E., Camilli, A. (2008) Immunization with *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Induces Protective Immunity in Mice. *INFECTION AND IMMUNITY*, Oct. 2008, p. 4554–4563 Vol. 76, No. 10 doi:10.1128/IAI.00532-08"

111. Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews. Microbiology*, 13(10), 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
112. Sierra-González, G. (2019) Cuban Meningococcal Vaccine VA-MENGOC-BC: 30 Years of Use and Future Potential. *MEDICC Review*. 2019, v. 21, n. 4, pp. 19-27. Epub 25 Nov 2019. ISSN 1555-7960.
113. Snapper, C. M., & Mond, J. J. (1993). Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunology Today*, 14(1), 15-17. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90318-F](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90318-F)
114. Snapper, C., & Paul, W. (1987) Interferon- $\gamma$  and B Cell Stimulatory Factor-1 Reciprocally Regulate Ig Isotype Production. *Science* 236, 944-947 (1987) .DOI:10.1126/science.3107127
115. Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 790–819. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x>
116. Sun J, Huang Y, Li X, Xu X, Cui X, Hao F, Ji Q, Chen C, Bao G, Liu Y. (2024) Characterization and immunological effect of outer membrane vesicles from *Pasteurella multocida* on macrophages. *Appl Microbiol Biotechnol*. 26 de febrero de 2024; 108(1):238. doi: 10.1007/s00253-024-13060-2. PMID: 38407600; PMCID: PMC10896778.
117. Suwansrinon, K., Jaikampun, K., & Sretrirutchai, S. (2005). *Citrobacter amalonaticus* isolated from a patient with meningitis: A case report. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88(7), 983-986.
118. Suwansrinon, K., Jaikampun, K., & Sretrirutchai, S. (2005). *Citrobacter amalonaticus* isolated from a patient with meningitis: A case report. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88(7), 983-986.
119. Tan, K., Li, R., Huang, X., & Liu, Q. (2018). Outer Membrane Vesicles: Current Status and Future Direction of These Novel Vaccine Adjuvants. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00783>
120. Tuhamize, B., Bazira, J. (2024). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the livestock, humans and environmental samples around the globe: a systematic review and meta-analysis. *Dental science reports*, 14(1) doi: 10.1038/s41598-024-64992-8
121. Valdés S., & Ángel M. (2017) Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and application. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* . 2017;16(3):402–419. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>
122. Velimirov, B., & Velimirov, B. A. (2024). Immune Responses Elicited by Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: Important Players in Vaccine Development. *Life (Basel, Switzerland)*, 14(12), 1584. <https://doi.org/10.3390/life14121584>
123. Wang, M., Yao, Y., Yang, Y., Zhu, D., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Huang, J., Ou, X., Tian, B., Sun, D., Zhang, L., Yu, Y., He, Y., Wu, Z., & Cheng, A. (2025). The characterization of outer membrane vesicles (OMV's) and their role in mediating antibiotic-resistance gene transfer through natural transformation in *Riemerella anatipestifer*. *Poultry Science*, 104(2), 104730–104730. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104730>
124. Weng, Z., Yang, N., Shi, S., Xu, Z., Chen, Z., Liang, C., Zhang, X., & Du, X. (2023). Outer Membrane Vesicles from *Acinetobacter baumannii*: Biogenesis, Functions, and Vaccine Application. *Vaccines*, 12(1), 49–49. <https://doi.org/10.3390/vaccines12010049>
125. Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley and Klein's Microbiology (7.<sup>a</sup> ed.). McGraw-Hill.
126. Wood, N., Kraft, A., Shin, K., Gopinath, T., & Marassi, F. M. (2025). In situ NMR reveals a pH sensor motif in an outer membrane protein that drives bacterial vesicle production. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America, 122(26).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2501638122>
127. Wong, V., Levi, K., Bick, D., & Chapman, T. (2012). *Citrobacter amalonaticus* human isolates: Genomic diversity and association with urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1442-1445.
  128. Wu X., Chavez JD, Schweppe DK, Zheng C., Weisbrod CR, Eng JK, Murali A., Lee SA, Ramage E., Gallagher LA et al. (2016) El análisis de la red de interacción de proteínas in vivo revela la inactivación de antibióticos localizada por porinas en la cepa AB5075 de *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Commun.* 2016;7:13414. doi: 10.1038/ncomms13414.
  129. Yang, Q., Wang, H., Sun, H., Chen, H., Xu, Y., & Chen, M. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 573–577.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01099-09>
  130. Yao, L., Wei, B., Wang, Y., Zhang, H., Zhou, K., & Li, J. (2023). A critical role of outer membrane vesicles in antibiotic resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22, 95. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00645-5>
  131. Yao, Y., Falgenhauer, L., Falgenhauer, J., Hauri, A. M., Heinmüller, P., Domann, E., Chakraborty, T., & Imirzalioglu, C. (2021). Carbapenem-Resistant *Citrobacter* spp. as an Emerging Concern in the Hospital-Setting: Results From a Genome-Based Regional Surveillance Study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 744431. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.744431>
  132. Yuan, C., Yin, Z., Wang, J., Qian, C., Wei, Y., Zhang, S., Jiang, L., & Liu, B. (2019). Comparative Genomic Analysis of *Citrobacter* and Key Genes Essential for the Pathogenicity of *Citrobacter koseri*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2774. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02774>
  133. Zhang, X., Qian, C., Tang, M., Zeng, W., Kong, J., Fu, C., Xu, C., Ye, J., & Zhou, T. (2023). Carbapenemase-loaded outer membrane vesicles protect *Pseudomonas aeruginosa* by degrading imipenem and promoting mutation of antimicrobial resistance gene. *Drug Resistance Updates*, 68, 100952–100952. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100952>
  134. Zingl, F. G., Thapa, H. B., Scharf, M., Kohl, P., Müller, A. M., & Schild, S. (2021). Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. *Mbio*, 12(3), e00534-21.

### 13. Anexos



**Anexo 1. Participaciones académicas.** XIX Congreso Nacional de Estudiantes de Microbiología y Parasitología celebrado en Septiembre 2024 en Acapulco, Guerrero.

| Buffer Salino de Fosfatos PBS (1 L) |       |      |                    |                   |
|-------------------------------------|-------|------|--------------------|-------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | KCl   | NaCl | NaHPO <sub>4</sub> | Agua tridestilada |
| 0.24 g                              | 0.2 g | 8 g  | 1.44 g             | 1 L               |

**Anexo 2. Composición del buffer salino de fosfatos,** una vez preparado y esterilizado es necesario ajustar el pH a 7.5 usando ácido clorhídrico.

| Buffer RIPA modificado (Radio-Immunoprecipitation Assay) (50 ml) |      |      |               |      |      |          |
|------------------------------------------------------------------|------|------|---------------|------|------|----------|
| Tritón                                                           | EDTA | NaCl | Beta Mercapto | SDS  | Tris | Tween 20 |
| 20x                                                              | 5 mM | 1 mM | 5 mM          | 0.1% | 5 mM | 20%      |

**Anexo 3. Componentes y concentraciones para el buffer RIPA modificado utilizado en la lisis celular de *Citrobacter freundii* y *Citrobacter amalonaticus*.**

| Buffer de carga de Laemmli (SDS-PAGE) |     |          |                    |               |
|---------------------------------------|-----|----------|--------------------|---------------|
| Tris 2M HCl pH 6.8                    | SDS | Glicerol | Azul de bromofenol | Beta mercapto |
| 2.5 ml                                | 2 g | 10 ml    | 100 mg             | 1 ml          |

**Anexo 4. Composición del buffer de Laemmli utilizado para SDS-PAGE (20 ml).**

| Composición del gel de poliacrilamida para SDS-PAGE |                      |                  |
|-----------------------------------------------------|----------------------|------------------|
|                                                     | Gel separador al 10% | Gel concentrador |
| <b>Agua</b>                                         | 1.39 mL              | 1.04 mL          |
| <b>Acrilamida al 30%</b>                            | 1.67 mL              | 320 µL           |
| <b>Bis acrilamida al 2%</b>                         | 0.68 mL              | 130 µL           |
| <b>Tris HCl 1.5M pH 8.8 SDS 0.4%</b>                | 1.25 mL              | -                |
| <b>Tris HCl 0.5M pH 6.8 SDS 0.4%</b>                | -                    | 500 µL           |
| <b>Persulfato de amonio 10%</b>                     | 60 µL                | 40 µL            |
| <b>TEMED</b>                                        | 6 µL                 | 3 µL             |

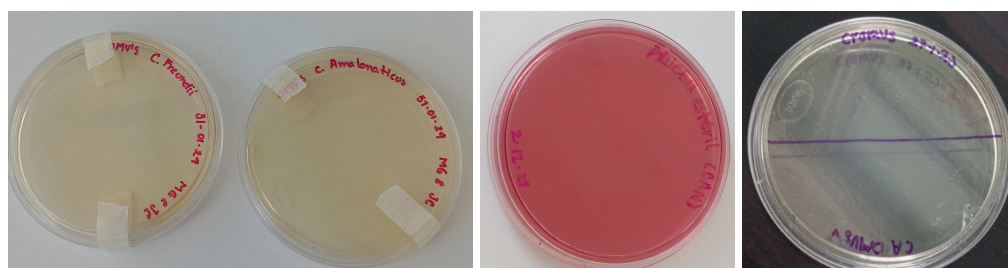
**Anexo 5. Composición general del gel para SDS-PAGE. Posteriormente a armar la base con los cristales, es necesario verter primero la fase separadora y una vez polimerizada, la fase concentradora con el peine para formar los pozos.**

| Buffer de migración SDS-PAGE (1 L) |           |         |                |
|------------------------------------|-----------|---------|----------------|
| Glicina                            | Tris-Base | SDS 10% | Agua destilada |
| 14.4 g                             | 3 g       | 10 mL   | 1 L            |

**Anexo 6. Composición de 1 L de buffer para migración SDS-PAGE.**

| Buffer de transferencia para Western blot (1 L) |           |         |         |                |
|-------------------------------------------------|-----------|---------|---------|----------------|
| Glicina                                         | Tris-Base | SDS 10% | Metanol | Agua destilada |
| 2.9 g                                           | 5.8 g     | 0.37 mL | 200 mL  | 800 mL         |

**Anexo 7. Composición de buffer para transferencia en Western blot. Se recomienda enfriar previamente el buffer antes de iniciar el protocolo.**



**Anexo 8. Pruebas de esterilidad de OMV's purificadas en medio LB, MacConkey y agar nutritivo.**

| Comparaciones múltiples de Tukey | Diferencia de medias ajustada (LS-mean) | IC 95%              | Valor p ajustado |
|----------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|------------------|
| IgG1:OMV-CA vs. IgG1:OMV-CF      | 0,2794                                  | 0.1917 to 0.3672    | <0.0001          |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG1:EPT-CA      | 1,117                                   | 1.019 to 1.215      | <0.0001          |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG1:EPT-CF      | 0,9869                                  | 0.8888 to 1.085     | <0.0001          |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2a:OMV-CA     | -0,2053                                 | -0.2931 to -0.1176  | <0.0001          |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2a:OMV-CF     | 0,1733                                  | 0.08552 to 0.2610   | <0.0001          |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2a:EPT-CA     | 1,146                                   | 1.048 to 1.244      | <0.0001          |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2a:EPT-CF     | 0,8987                                  | 0.8006 to 0.9968    | <0.0001          |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2b:OMV-CA     | -0,1324                                 | -0.2202 to -0.04468 | 0,0002           |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2b:OMV-CF     | 0,2052                                  | 0.1175 to 0.2930    | <0.0001          |

|                              |          |                     |         |
|------------------------------|----------|---------------------|---------|
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2b:EPT-CA | 1,104    | 1.006 to 1.202      | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG2b:EPT-CF | 0,8219   | 0.7238 to 0.9200    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG3:OMV-CA  | -0,08299 | -0.1707 to 0.004754 | 0,0828  |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG3:OMV-CF  | 0,1597   | 0.07196 to 0.2475   | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CA  | 1,108    | 1.010 to 1.206      | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CF  | 0,9543   | 0.8562 to 1.052     | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgA:OMV-CA   | 0,07478  | -0.01297 to 0.1625  | 0,1832  |
| IgG1:OMV-CA vs. IgA:OMV-CF   | 0,3805   | 0.2927 to 0.4682    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgA:EPT-CA   | 1,115    | 1.017 to 1.214      | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgA:EPT-CF   | 0,9102   | 0.8121 to 1.008     | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgM:OMV-CA   | 0,1528   | 0.06505 to 0.2405   | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgM:OMV-CF   | 0,4163   | 0.3285 to 0.5040    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgM:EPT-CA   | 1,108    | 1.010 to 1.206      | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CA vs. IgM:EPT-CF   | 0,9485   | 0.8504 to 1.047     | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG1:EPT-CA  | 0,8379   | 0.7398 to 0.9360    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG1:EPT-CF  | 0,7075   | 0.6094 to 0.8056    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2a:OMV-CA | -0,4847  | -0.5725 to -0.3970  | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2a:OMV-CF | -0,1062  | -0.1939 to -0.01841 | 0,0057  |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2a:EPT-CA | 0,8667   | 0.7686 to 0.9648    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2a:EPT-CF | 0,6192   | 0.5211 to 0.7173    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2b:OMV-CA | -0,4118  | -0.4996 to -0.3241  | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2b:OMV-CF | -0,07418 | -0.1619 to 0.01356  | 0,1931  |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2b:EPT-CA | 0,8245   | 0.7264 to 0.9226    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG2b:EPT-CF | 0,5425   | 0.4444 to 0.6406    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG3:OMV-CA  | -0,3624  | -0.4501 to -0.2747  | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG3:OMV-CF  | -0,1197  | -0.2075 to -0.03196 | 0,001   |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CA  | 0,8284   | 0.7303 to 0.9265    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CF  | 0,6749   | 0.5768 to 0.7730    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgA:OMV-CA   | -0,2046  | -0.2924 to -0.1169  | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgA:OMV-CF   | 0,101    | 0.01330 to 0.1888   | 0,0107  |
| IgG1:OMV-CF vs. IgA:EPT-CA   | 0,836    | 0.7379 to 0.9341    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgA:EPT-CF   | 0,6307   | 0.5326 to 0.7288    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgM:OMV-CA   | -0,1266  | -0.2144 to -0.03888 | 0,0004  |
| IgG1:OMV-CF vs. IgM:OMV-CF   | 0,1369   | 0.04911 to 0.2246   | 0,0001  |
| IgG1:OMV-CF vs. IgM:EPT-CA   | 0,8284   | 0.7303 to 0.9265    | <0.0001 |
| IgG1:OMV-CF vs. IgM:EPT-CF   | 0,6691   | 0.5710 to 0.7672    | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG1:EPT-CF  | -0,1305  | -0.2379 to -0.02299 | 0,0054  |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2a:OMV-CA | -1,323   | -1.421 to -1.225    | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2a:OMV-CF | -0,9441  | -1.042 to -0.8460   | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2a:EPT-CA | 0,02878  | -0.07869 to 0.1362  | >0.9999 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2a:EPT-CF | -0,2187  | -0.3262 to -0.1112  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2b:OMV-CA | -1,25    | -1.348 to -1.152    | <0.0001 |

|                               |           |                     |         |
|-------------------------------|-----------|---------------------|---------|
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2b:OMV-CF  | -0,9121   | -1.010 to -0.8140   | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2b:EPT-CA  | -0,01343  | -0.1209 to 0.09403  | >0.9999 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG2b:EPT-CF  | -0,2954   | -0.4029 to -0.1880  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG3:OMV-CA   | -1,2      | -1.298 to -1.102    | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG3:OMV-CF   | -0,9577   | -1.056 to -0.8596   | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG3:EPT-CA   | -0,009593 | -0.1171 to 0.09787  | >0.9999 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgG3:EPT-CF   | -0,1631   | -0.2705 to -0.05561 | 0,0002  |
| IgG1:EPT-CA vs. IgA:OMV-CA    | -1,043    | -1.141 to -0.9445   | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgA:OMV-CF    | -0,7369   | -0.8350 to -0.6388  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgA:EPT-CA    | -0,001918 | -0.1094 to 0.1055   | >0.9999 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgA:EPT-CF    | -0,2072   | -0.3147 to -0.09973 | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgM:OMV-CA    | -0,9646   | -1.063 to -0.8665   | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgM:OMV-CF    | -0,7011   | -0.7992 to -0.6030  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgM:EPT-CA    | -0,009593 | -0.1171 to 0.09787  | >0.9999 |
| IgG1:EPT-CA vs. IgM:EPT-CF    | -0,1688   | -0.2763 to -0.06136 | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2a:OMV-CA  | -1,192    | -1.290 to -1.094    | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2a:OMV-CF  | -0,8136   | -0.9117 to -0.7155  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2a:EPT-CA  | 0,1592    | 0.05177 to 0.2667   | 0,0003  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2a:EPT-CF  | -0,08825  | -0.1957 to 0.01921  | 0,2321  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2b:OMV-CA  | -1,119    | -1.217 to -1.021    | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2b:OMV-CF  | -0,7817   | -0.8798 to -0.6836  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2b:EPT-CA  | 0,117     | 0.009565 to 0.2245  | 0,0206  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG2b:EPT-CF  | -0,165    | -0.2725 to -0.05753 | 0,0001  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG3:OMV-CA   | -1,07     | -1.168 to -0.9718   | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG3:OMV-CF   | -0,8272   | -0.9253 to -0.7291  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG3:EPT-CA   | 0,1209    | 0.01340 to 0.2283   | 0,0142  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgG3:EPT-CF   | -0,03261  | -0.1401 to 0.07485  | 0,9999  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgA:OMV-CA    | -0,9121   | -1.010 to -0.8140   | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgA:OMV-CF    | -0,6064   | -0.7045 to -0.5083  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgA:EPT-CA    | 0,1285    | 0.02108 to 0.2360   | 0,0066  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgA:EPT-CF    | -0,07674  | -0.1842 to 0.03072  | 0,4648  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgM:OMV-CA    | -0,8341   | -0.9322 to -0.7360  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgM:OMV-CF    | -0,5706   | -0.6687 to -0.4725  | <0.0001 |
| IgG1:EPT-CF vs. IgM:EPT-CA    | 0,1209    | 0.01340 to 0.2283   | 0,0142  |
| IgG1:EPT-CF vs. IgM:EPT-CF    | -0,03837  | -0.1458 to 0.06909  | 0,9985  |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG2a:OMV-CF | 0,3786    | 0.2908 to 0.4663    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG2a:EPT-CA | 1,351     | 1.253 to 1.450      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG2a:EPT-CF | 1,104     | 1.006 to 1.202      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG2b:OMV-CA | 0,0729    | -0.01484 to 0.1606  | 0,2159  |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG2b:OMV-CF | 0,4106    | 0.3228 to 0.4983    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG2b:EPT-CA | 1,309     | 1.211 to 1.407      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG2b:EPT-CF | 1,027     | 0.9291 to 1.125     | <0.0001 |

|                               |          |                     |         |
|-------------------------------|----------|---------------------|---------|
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG3:OMV-CA  | 0,1223   | 0.03459 to 0.2101   | 0,0007  |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG3:OMV-CF  | 0,365    | 0.2773 to 0.4528    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CA  | 1,313    | 1.215 to 1.411      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CF  | 1,16     | 1.062 to 1.258      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgA:OMV-CA   | 0,2801   | 0.1924 to 0.3678    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgA:OMV-CF   | 0,5858   | 0.4980 to 0.6735    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgA:EPT-CA   | 1,321    | 1.223 to 1.419      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgA:EPT-CF   | 1,115    | 1.017 to 1.214      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgM:OMV-CA   | 0,3581   | 0.2704 to 0.4459    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgM:OMV-CF   | 0,6216   | 0.5339 to 0.7093    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgM:EPT-CA   | 1,313    | 1.215 to 1.411      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CA vs. IgM:EPT-CF   | 1,154    | 1.056 to 1.252      | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG2a:EPT-CA | 0,9729   | 0.8748 to 1.071     | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG2a:EPT-CF | 0,7254   | 0.6273 to 0.8235    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG2b:OMV-CA | -0,3057  | -0.3934 to -0.2179  | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG2b:OMV-CF | 0,03198  | -0.05577 to 0.1197  | 0,9981  |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG2b:EPT-CA | 0,9307   | 0.8326 to 1.029     | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG2b:EPT-CF | 0,6487   | 0.5506 to 0.7468    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG3:OMV-CA  | -0,2562  | -0.3440 to -0.1685  | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG3:OMV-CF  | -0,01355 | -0.1013 to 0.07419  | >0.9999 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CA  | 0,9345   | 0.8364 to 1.033     | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CF  | 0,781    | 0.6829 to 0.8791    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgA:OMV-CA   | -0,09848 | -0.1862 to -0.01074 | 0,0146  |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgA:OMV-CF   | 0,2072   | 0.1195 to 0.2949    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgA:EPT-CA   | 0,9422   | 0.8441 to 1.040     | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgA:EPT-CF   | 0,7369   | 0.6388 to 0.8350    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgM:OMV-CA   | -0,02046 | -0.1082 to 0.06728  | >0.9999 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgM:OMV-CF   | 0,243    | 0.1553 to 0.3308    | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgM:EPT-CA   | 0,9345   | 0.8364 to 1.033     | <0.0001 |
| IgG2a:OMV-CF vs. IgM:EPT-CF   | 0,7753   | 0.6772 to 0.8734    | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG2a:EPT-CF | -0,2475  | -0.3550 to -0.1400  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG2b:OMV-CA | -1,279   | -1.377 to -1.180    | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG2b:OMV-CF | -0,9409  | -1.039 to -0.8428   | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG2b:EPT-CA | -0,04221 | -0.1497 to 0.06526  | 0,995   |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG2b:EPT-CF | -0,3242  | -0.4317 to -0.2168  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG3:OMV-CA  | -1,229   | -1.327 to -1.131    | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG3:OMV-CF  | -0,9864  | -1.085 to -0.8883   | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG3:EPT-CA  | -0,03837 | -0.1458 to 0.06909  | 0,9985  |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgG3:EPT-CF  | -0,1919  | -0.2993 to -0.08439 | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgA:OMV-CA   | -1,071   | -1.169 to -0.9733   | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgA:OMV-CF   | -0,7657  | -0.8638 to -0.6676  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgA:EPT-CA   | -0,0307  | -0.1382 to 0.07677  | >0.9999 |

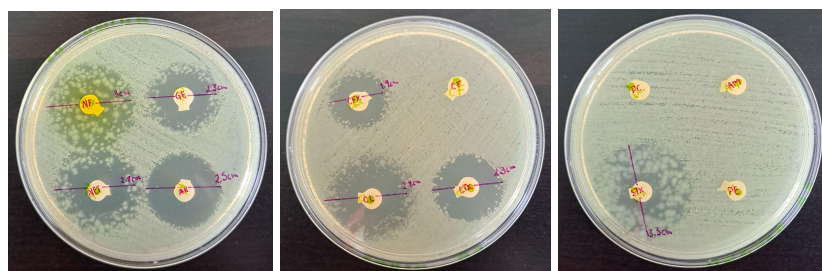
|                               |          |                     |         |
|-------------------------------|----------|---------------------|---------|
| IgG2a:EPT-CA vs. IgA:EPT-CF   | -0,236   | -0.3434 to -0.1285  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgM:OMV-CA   | -0,9933  | -1.091 to -0.8952   | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgM:OMV-CF   | -0,7299  | -0.8280 to -0.6318  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgM:EPT-CA   | -0,03837 | -0.1458 to 0.06909  | 0,9985  |
| IgG2a:EPT-CA vs. IgM:EPT-CF   | -0,1976  | -0.3051 to -0.09014 | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG2b:OMV-CA | -1,031   | -1.129 to -0.9330   | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG2b:OMV-CF | -0,6934  | -0.7915 to -0.5953  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG2b:EPT-CA | 0,2053   | 0.09782 to 0.3127   | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG2b:EPT-CF | -0,07674 | -0.1842 to 0.03072  | 0,4648  |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG3:OMV-CA  | -0,9816  | -1.080 to -0.8835   | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG3:OMV-CF  | -0,7389  | -0.8370 to -0.6408  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG3:EPT-CA  | 0,2091   | 0.1017 to 0.3166    | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgG3:EPT-CF  | 0,05564  | -0.05183 to 0.1631  | 0,9145  |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgA:OMV-CA   | -0,8239  | -0.9220 to -0.7258  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgA:OMV-CF   | -0,5182  | -0.6163 to -0.4201  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgA:EPT-CA   | 0,2168   | 0.1093 to 0.3243    | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgA:EPT-CF   | 0,01151  | -0.09595 to 0.1190  | >0.9999 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgM:OMV-CA   | -0,7459  | -0.8440 to -0.6478  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgM:OMV-CF   | -0,4824  | -0.5805 to -0.3843  | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgM:EPT-CA   | 0,2091   | 0.1017 to 0.3166    | <0.0001 |
| IgG2a:EPT-CF vs. IgM:EPT-CF   | 0,04988  | -0.05758 to 0.1573  | 0,968   |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgG2b:OMV-CF | 0,3377   | 0.2499 to 0.4254    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgG2b:EPT-CA | 1,236    | 1.138 to 1.334      | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgG2b:EPT-CF | 0,9543   | 0.8562 to 1.052     | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgG3:OMV-CA  | 0,04943  | -0.03831 to 0.1372  | 0,8391  |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgG3:OMV-CF  | 0,2921   | 0.2044 to 0.3799    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CA  | 1,24     | 1.142 to 1.338      | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CF  | 1,087    | 0.9886 to 1.185     | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgA:OMV-CA   | 0,2072   | 0.1195 to 0.2949    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgA:OMV-CF   | 0,5129   | 0.4251 to 0.6006    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgA:EPT-CA   | 1,248    | 1.150 to 1.346      | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgA:EPT-CF   | 1,043    | 0.9445 to 1.141     | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgM:OMV-CA   | 0,2852   | 0.1975 to 0.3730    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgM:OMV-CF   | 0,5487   | 0.4609 to 0.6364    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgM:EPT-CA   | 1,24     | 1.142 to 1.338      | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CA vs. IgM:EPT-CF   | 1,081    | 0.9829 to 1.179     | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgG2b:EPT-CA | 0,8987   | 0.8006 to 0.9968    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgG2b:EPT-CF | 0,6167   | 0.5186 to 0.7148    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgG3:OMV-CA  | -0,2882  | -0.3760 to -0.2005  | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgG3:OMV-CF  | -0,04553 | -0.1333 to 0.04222  | 0,913   |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CA  | 0,9025   | 0.8044 to 1.001     | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CF  | 0,7491   | 0.6510 to 0.8472    | <0.0001 |

|                               |          |                     |         |
|-------------------------------|----------|---------------------|---------|
| IgG2b:OMV-CF vs. IgA:OMV-CA   | -0,1305  | -0.2182 to -0.04271 | 0,0002  |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgA:OMV-CF   | 0,1752   | 0.08748 to 0.2630   | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgA:EPT-CA   | 0,9102   | 0.8121 to 1.008     | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgA:EPT-CF   | 0,7049   | 0.6068 to 0.8030    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgM:OMV-CA   | -0,05244 | -0.1402 to 0.03530  | 0,7654  |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgM:OMV-CF   | 0,211    | 0.1233 to 0.2988    | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgM:EPT-CA   | 0,9025   | 0.8044 to 1.001     | <0.0001 |
| IgG2b:OMV-CF vs. IgM:EPT-CF   | 0,7433   | 0.6452 to 0.8414    | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgG2b:EPT-CF | -0,282   | -0.3895 to -0.1746  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgG3:OMV-CA  | -1,187   | -1.285 to -1.089    | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgG3:OMV-CF  | -0,9442  | -1.042 to -0.8461   | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgG3:EPT-CA  | 0,003837 | -0.1036 to 0.1113   | >0.9999 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgG3:EPT-CF  | -0,1496  | -0.2571 to -0.04218 | 0,0007  |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgA:OMV-CA   | -1,029   | -1.127 to -0.9311   | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgA:OMV-CF   | -0,7235  | -0.8216 to -0.6254  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgA:EPT-CA   | 0,01151  | -0.09595 to 0.1190  | >0.9999 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgA:EPT-CF   | -0,1938  | -0.3012 to -0.08630 | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgM:OMV-CA   | -0,9511  | -1.049 to -0.8530   | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgM:OMV-CF   | -0,6877  | -0.7858 to -0.5896  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgM:EPT-CA   | 0,003837 | -0.1036 to 0.1113   | >0.9999 |
| IgG2b:EPT-CA vs. IgM:EPT-CF   | -0,1554  | -0.2629 to -0.04793 | 0,0004  |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgG3:OMV-CA  | -0,9049  | -1.003 to -0.8068   | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgG3:OMV-CF  | -0,6622  | -0.7603 to -0.5641  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgG3:EPT-CA  | 0,2859   | 0.1784 to 0.3933    | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgG3:EPT-CF  | 0,1324   | 0.02491 to 0.2398   | 0,0045  |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgA:OMV-CA   | -0,7471  | -0.8452 to -0.6490  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgA:OMV-CF   | -0,4415  | -0.5396 to -0.3434  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgA:EPT-CA   | 0,2935   | 0.1861 to 0.4010    | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgA:EPT-CF   | 0,08825  | -0.01921 to 0.1957  | 0,2321  |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgM:OMV-CA   | -0,6691  | -0.7672 to -0.5710  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgM:OMV-CF   | -0,4056  | -0.5037 to -0.3075  | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgM:EPT-CA   | 0,2859   | 0.1784 to 0.3933    | <0.0001 |
| IgG2b:EPT-CF vs. IgM:EPT-CF   | 0,1266   | 0.01916 to 0.2341   | 0,008   |
| IgG3:OMV-CA vs. IgG3:OMV-CF   | 0,2427   | 0.1550 to 0.3304    | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CA   | 1,191    | 1.093 to 1.289      | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgG3:EPT-CF   | 1,037    | 0.9392 to 1.135     | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgA:OMV-CA    | 0,1578   | 0.07002 to 0.2455   | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgA:OMV-CF    | 0,4634   | 0.3757 to 0.5512    | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgA:EPT-CA    | 1,198    | 1.100 to 1.297      | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgA:EPT-CF    | 0,9932   | 0.8951 to 1.091     | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgM:OMV-CA    | 0,2358   | 0.1480 to 0.3235    | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgM:OMV-CF    | 0,4993   | 0.4115 to 0.5870    | <0.0001 |

|                             |           |                     |         |
|-----------------------------|-----------|---------------------|---------|
| IgG3:OMV-CA vs. IgM:EPT-CA  | 1,191     | 1.093 to 1.289      | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CA vs. IgM:EPT-CF  | 1,032     | 0.9334 to 1.130     | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CA | 0,9481    | 0.8500 to 1.046     | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgG3:EPT-CF | 0,7946    | 0.6965 to 0.8927    | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgA:OMV-CA  | -0,08493  | -0.1727 to 0.002812 | 0,0676  |
| IgG3:OMV-CF vs. IgA:OMV-CF  | 0,2207    | 0.1330 to 0.3085    | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgA:EPT-CA  | 0,9557    | 0.8576 to 1.054     | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgA:EPT-CF  | 0,7505    | 0.6524 to 0.8486    | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgM:OMV-CA  | -0,006912 | -0.09466 to 0.08083 | >0.9999 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgM:OMV-CF  | 0,2566    | 0.1688 to 0.3443    | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgM:EPT-CA  | 0,9481    | 0.8500 to 1.046     | <0.0001 |
| IgG3:OMV-CF vs. IgM:EPT-CF  | 0,7888    | 0.6907 to 0.8869    | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgG3:EPT-CF | -0,1535   | -0.2609 to -0.04602 | 0,0005  |
| IgG3:EPT-CA vs. IgA:OMV-CA  | -1,033    | -1.131 to -0.9349   | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgA:OMV-CF  | -0,7273   | -0.8254 to -0.6292  | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgA:EPT-CA  | 0,007674  | -0.09979 to 0.1151  | >0.9999 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgA:EPT-CF  | -0,1976   | -0.3051 to -0.09014 | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgM:OMV-CA  | -0,955    | -1.053 to -0.8569   | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgM:OMV-CF  | -0,6915   | -0.7896 to -0.5934  | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgM:EPT-CA  | 0         | -0.1075 to 0.1075   | >0.9999 |
| IgG3:EPT-CA vs. IgM:EPT-CF  | -0,1592   | -0.2667 to -0.05177 | 0,0003  |
| IgG3:EPT-CF vs. IgA:OMV-CA  | -0,8795   | -0.9776 to -0.7814  | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CF vs. IgA:OMV-CF  | -0,5738   | -0.6719 to -0.4757  | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CF vs. IgA:EPT-CA  | 0,1612    | 0.05369 to 0.2686   | 0,0002  |
| IgG3:EPT-CF vs. IgA:EPT-CF  | -0,04413  | -0.1516 to 0.06334  | 0,9915  |
| IgG3:EPT-CF vs. IgM:OMV-CA  | -0,8015   | -0.8996 to -0.7034  | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CF vs. IgM:OMV-CF  | -0,538    | -0.6361 to -0.4399  | <0.0001 |
| IgG3:EPT-CF vs. IgM:EPT-CA  | 0,1535    | 0.04602 to 0.2609   | 0,0005  |
| IgG3:EPT-CF vs. IgM:EPT-CF  | -0,005756 | -0.1132 to 0.1017   | >0.9999 |
| IgA:OMV-CA vs. IgA:OMV-CF   | 0,3057    | 0.2179 to 0.3934    | <0.0001 |
| IgA:OMV-CA vs. IgA:EPT-CA   | 1,041     | 0.9426 to 1.139     | <0.0001 |
| IgA:OMV-CA vs. IgA:EPT-CF   | 0,8354    | 0.7373 to 0.9335    | <0.0001 |
| IgA:OMV-CA vs. IgM:OMV-CA   | 0,07802   | -0.009725 to 0.1658 | 0,1357  |
| IgA:OMV-CA vs. IgM:OMV-CF   | 0,3415    | 0.2537 to 0.4292    | <0.0001 |
| IgA:OMV-CA vs. IgM:EPT-CA   | 1,033     | 0.9349 to 1.131     | <0.0001 |
| IgA:OMV-CA vs. IgM:EPT-CF   | 0,8738    | 0.7757 to 0.9719    | <0.0001 |
| IgA:OMV-CF vs. IgA:EPT-CA   | 0,735     | 0.6369 to 0.8331    | <0.0001 |
| IgA:OMV-CF vs. IgA:EPT-CF   | 0,5297    | 0.4316 to 0.6278    | <0.0001 |
| IgA:OMV-CF vs. IgM:OMV-CA   | -0,2277   | -0.3154 to -0.1399  | <0.0001 |
| IgA:OMV-CF vs. IgM:OMV-CF   | 0,03581   | -0.05193 to 0.1236  | 0,9921  |
| IgA:OMV-CF vs. IgM:EPT-CA   | 0,7273    | 0.6292 to 0.8254    | <0.0001 |
| IgA:OMV-CF vs. IgM:EPT-CF   | 0,5681    | 0.4700 to 0.6662    | <0.0001 |

|                           |           |                     |         |
|---------------------------|-----------|---------------------|---------|
| IgA:EPT-CA vs. IgA:EPT-CF | -0,2053   | -0.3127 to -0.09782 | <0.0001 |
| IgA:EPT-CA vs. IgM:OMV-CA | -0,9626   | -1.061 to -0.8645   | <0.0001 |
| IgA:EPT-CA vs. IgM:OMV-CF | -0,6992   | -0.7973 to -0.6011  | <0.0001 |
| IgA:EPT-CA vs. IgM:EPT-CA | -0,007674 | -0.1151 to 0.09979  | >0.9999 |
| IgA:EPT-CA vs. IgM:EPT-CF | -0,1669   | -0.2744 to -0.05945 | 0,0001  |
| IgA:EPT-CF vs. IgM:OMV-CA | -0,7574   | -0.8555 to -0.6593  | <0.0001 |
| IgA:EPT-CF vs. IgM:OMV-CF | -0,4939   | -0.5920 to -0.3958  | <0.0001 |
| IgA:EPT-CF vs. IgM:EPT-CA | 0,1976    | 0.09014 to 0.3051   | <0.0001 |
| IgA:EPT-CF vs. IgM:EPT-CF | 0,03837   | -0.06909 to 0.1458  | 0,9985  |
| IgM:OMV-CA vs. IgM:OMV-CF | 0,2635    | 0.1757 to 0.3512    | <0.0001 |
| IgM:OMV-CA vs. IgM:EPT-CA | 0,955     | 0.8569 to 1.053     | <0.0001 |
| IgM:OMV-CA vs. IgM:EPT-CF | 0,7957    | 0.6976 to 0.8938    | <0.0001 |
| IgM:OMV-CF vs. IgM:EPT-CA | 0,6915    | 0.5934 to 0.7896    | <0.0001 |
| IgM:OMV-CF vs. IgM:EPT-CF | 0,5323    | 0.4342 to 0.6304    | <0.0001 |
| IgM:EPT-CA vs. IgM:EPT-CF | -0,1592   | -0.2667 to -0.05177 | 0,0003  |

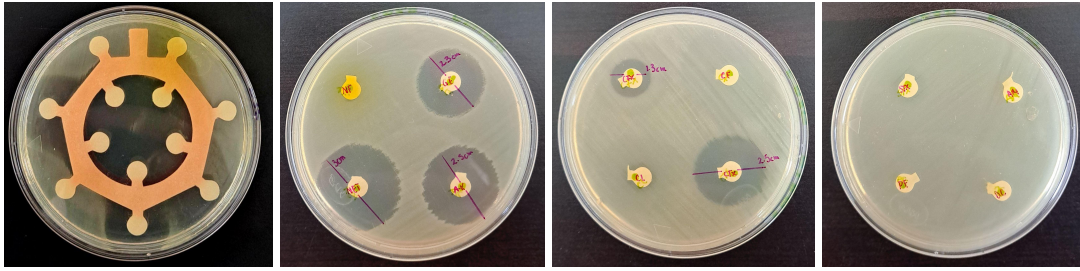
**Anexo 9. Tabla de comparaciones múltiples de Tukey.  $\alpha = 0.05$**



**Anexo 10. Antibiograma de *Citrobacter amalonaticus* con heterorresistencia.**



**Anexo 11. Antibiograma de *Citrobacter freundii* con heterorresistencia.**



**Anexo 12. Antibiograma de *E. coli* transformada con OMV's de *C. amalonaticus*.**



**Anexo 13. Antibiograma de *E. coli* transformada con OMV's de *C. freundii*.**