



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

“CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE OMVs
PURIFICADAS DE AISLADOS CLÍNICOS DE
Klebsiella pneumoniae”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
CON OPCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

L.B. SOFÍA ESPINOSA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

D. C. YGNACIO MARTÍNEZ LAGUNA

CODIRECTOR DE TESIS

D.C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA



OCTUBRE, 2024



BUAP

Puebla, Pue. a 25 de octubre 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

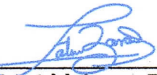
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría de la alumna **Sofía Espinosa Hernández**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Caracterización inmunológica de OMVs purificadas de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*”

A nuestro juicio, la alumna **Sofía Espinosa Hernández** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. Cristina González Vázquez


D.C. Alberto Ramírez Mata



Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme cumplir esta meta tan importante y guiarme en cada paso; así como a los 30 ratones[†] que me permitieron trabajar con ellos. Desde el fondo de mi corazón y mi alma, agradezco a mí mamá, M. D. Ruth Hernández Cervantes, un pilar muy importante para mí.

A mis asesores, D.C. Ygnacio Martínez L. y D.C. Alejandro Carabarin L., muchas gracias por su apoyo y por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, que me ayudó a crecer muchísimo profesional y personalmente; espero siempre poder tenerlos como mis mentores.

Gracias a mi comité tutorial: D.C. Patricia Lozano Z., D.C. Rosa del Carmen Rocha G., D.C. María Crsitina González V. y D.C. Alberto Ramírez M. cada una de sus revisiones me ayudó a siempre tener una visión de como mejorar y crecer como científica. De igual manera, agradezco al D.C. César López C. por el conocimiento y guía que me brindo en Oxford, es una gran inspiración. Continuando con mis mentores, agradezco al D.C. Jorge Antonio Yañez S. por permitirme utilizar las herramientas disponibles del CDB y encaminarme con sus consejos hacia mi futuro como investigadora.

Agradezco a mi familia por siempre tener el tiempo de escuchar los temas científicos que tenía para compartirles, por todo su apoyo y cariño. En especial a Nestor Iván, Martha, Roberto y Edgar por ser mis maestros de vida.

Gracias a mis amigos por siempre estar ahí, por acompañarme en este viaje, por las risas, amor y ayuda; en especial a Asaf, Héctor, Gaby, Johana, Ale, Xime, Oly, Aylin, Jenny, Karen, Mary, Uri, Adrian, Paty por hacer del chiqui lab un lugar lleno de felicidad, amor y aprendizaje. También gracias a Diego, Bren, Lore, Armando, Zullim, Jorge, Nina, Rous, Jair, Joel, Majo por compartir conmigo cada clase y por ser el mejor grupo de maestría con el que pude estar, espero verlos como colegas más adelante.

Por último, quiero agradecer a la D. C. Elsa[†] Iracena Castañeda R. por contagiarme su pasión por la ciencia y enseñar a aquellos que están dispuestos a aprender y a la D. C. Ma. Del Rocío Baños L. por apoyarme siempre, sus consejos, materiales y amistad.

Agradecimientos institucionales

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por la beca de movilidad otorgada para realizar el proyecto titulado “Mejora de la administración de vacunas de ARNm a través de formulaciones de nanopartículas lipídicas” en la Universidad de Oxford 2023.

Agradezco a la Vicerrectoria de Investigación y Estudios de Posgrado por la beca del 100% otorgada para realizar el Diplomado de Comunicación Pública de Ciencia y Tecnología y Periodismo Científico, que responde al llamado que se hace a través de la UNESCO, en su programa 2030; del Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024 y del Plan de Desarrollo Institucional BUAP 2021-2025.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyt) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría, con Número de Apoyo:822894.

Agradezco a la Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica (AMIP) por la beca completa de inscripción otorgada para asistir al XLI Congreso Interamericano de Infectologia Pediatrica “Dr. José Luis Castañeda Narváez”

Dedicatoria

*A mi madre,
por ayudamé a cumplir mis sueños,
por decir las palabras necesarias para motivarme,
por darme más que la mano para poder continuar a pesar de todo.
Te amo muchísimo.*

Contenido

| | |
|---|-----------|
| Índice de Tablas..... | 8 |
| Índice de Figuras..... | 8 |
| Resumen..... | 10 |
| 1 Introducción | 13 |
| 1.1 Enterobacterias..... | 13 |
| 1.2 Definición de infección..... | 13 |
| 1.3 Resistencia a antibióticos | 14 |
| 1.4 Importancia clínica a nivel mundial | 14 |
| 2 Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) | 16 |
| 3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 16 |
| 3.1 Fenotipo | 17 |
| 3.2 Colonización..... | 18 |
| 3.3 Infección | 19 |
| 3.4 Mecanismos de patogenicidad | 19 |
| 3.4.1 Movilidad | 21 |
| 3.5 Factores de virulencia | 21 |
| 3.6 Respuesta del sistema inmune | 23 |
| 3.7 Tratamiento | 25 |
| 4 Vesículas de membrana externa (OMVs) | 25 |
| 4.1 Funciones de las OMVs | 27 |
| 5 Modelo murino para la generación de anticuerpos por OMVs | 28 |
| 5.1 Modelo BALB/c | 28 |
| 5.2 Vía de inmunización para obtener antiseros policlonales | 28 |
| 5.3 Adyuvantes | 29 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.4 | Modelo murino para <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 29 |
| 6 | Antecedentes | 30 |
| 7 | Justificación | 30 |
| 8 | Hipótesis | 31 |
| 9 | Objetivo | 31 |
| 9.1 | Objetivos particulares | 31 |
| 9.1.1 | Objetivos específicos | 31 |
| 10 | Materiales y métodos | 32 |
| 10.1 | Cultivo e inoculación de aislados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 32 |
| 10.2 | Obtención y purificación de OMVs de KpATCC700603, KpBUAP003 y KpBUAP021..... | 33 |
| 10.3 | Identificación de las OMVs | 33 |
| 10.4 | Cuantificación de proteínas presentes en las OMVs por el método de Bradford | 34 |
| 10.5 | Obtención de sueros preinmunes e inmunización en modelo murino (BALB/c) | 34 |
| 10.6 | Obtención de sueros hiperinmunes..... | 35 |
| 10.7 | Título de anticuerpos | 36 |
| 10.8 | Isotipificación de anticuerpos..... | 37 |
| 10.9 | Espectrometría de masas MALDI-TOF..... | 37 |
| 10.10 | Análisis bioinformático de las proteínas identificadas por proteómica | 38 |
| 10.11 | Western blot en membranas de nitrocelulosa con los extractos totales bacterianos y de las OMVS | 38 |
| 10.12 | Inmunofluorescencia de las OMVs y bacterias utilizando los anticuerpos anti-OMVs | 39 |
| 10.13 | Sensibilidad a antibióticos mediado por anticuepos anti-OMVs | 40 |
| 10.14 | Ensayo de la actividad de movilidad..... | 41 |
| 10.15 | Actividad bactericida de los anticuerpos | 41 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 10.16 | Análisis estadístico..... | 42 |
| 11 | Resultados..... | 42 |
| 11.1 | Identificación de las OMVs de los aislados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> | 42 |
| 11.2 | Respuesta inmune generada | 45 |
| 11.3 | Proteoma de las OMVs de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 48 |
| 11.4 | Perfiles proteicos de los extractos bacterianos y extractos de las OMVs..... | 54 |
| 11.5 | Identificación de Proteínas potencialmente inmunogénicas en <i>Klebsiella pneumoniae</i> 58 | |
| 11.6 | Especificidad de los anticuerpos anti-OMVs mediante inmunofluorescencia | 61 |
| 11.7 | Cambios en la susceptibilidad de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a antibióticos posterior a la interacción con los anticuerpos anti-OMVs..... | 64 |
| 11.8 | Alteración en la movilidad de <i>Klebsiella pneumoniae</i> mediada por los anticuerpos anti-OMVs..... | 71 |
| 11.9 | Análisis de la eficacia bactericida de los anticuerpos anti-OMVs purificados contra <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> | 73 |
| 12 | Discusión | 75 |
| 13 | Conclusión | 85 |
| 14 | Futuras líneas de Investigación | 88 |
| 15 | Bibliografía..... | 89 |
| 16 | Anexos..... | 110 |
| 16.1 | Información sobre <i>Citrobacter freundii</i> (Control de multidrogresistencia). | 110 |
| 16.2 | Protocolo de precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio..... | 110 |
| 16.3 | Información sobre el control positivo utilizado para los ensayos de movilidad. | 110 |
| 16.4 | Información sobre el control negativo utilizado para los ensayos de movilidad..... | 111 |
| 16.5 | Nombre de las 72 proteínas propias de las OMVs de KpATCC700603..... | 112 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 16.6 | Nombre de las 142 proteínas propias de las OMVs de KpBUAP021..... | 114 |
| 16.7 | Nombre de las 5 proteínas propias de las OMVs de KpBUAP003. | 117 |
| 16.8 | Tabla de resultados del análisis de inmunogenicidad en el software Vaxijen v3.0 de las posibles proteínas reconocidas en el Western blot. | 118 |
| 16.9 | Imágenes de las inmunofluorescencias obtenidas de KpATCC700603 con su anticuerpo homólogo (anti-OMVsATTC)..... | 119 |
| 16.10 | Imágenes de las inmunofluorescencias obtenidas de KpBUAP021 con su anticuerpo homólogo (anti-OMVs021). | 120 |
| 16.11 | Imágenes de las inmunofluorescencias obtenidas de KpBUAP003 con su anticuerpo homólogo (anti-OMVs003). | 122 |
| 16.12 | Títulos de los anticuerpos anti-OMVs semana 7, posterior a la purificación..... | 124 |
| 16.13 | SDS-PAGE al 12% de los anticuerpos anti-OMVs semana 7, posterior a la purificación. | 124 |
| 16.14 | Western blot de los anticuerpos anti-OMVs semana 7, posterior a la purificación. 125 | |
| 16.15 | Tabla de las proteínas con actividad <i>moonlighting</i> presentes en las OMVs de las tres cepas, a partir de la base de datos MoonDB. | 126 |
| 16.16 | Tabla de las proteínas con actividad <i>moonlighting</i> presentes en las OMVs de las tres cepas, a partir de la base de datos MoonProt. | 127 |
| 16.17 | Factores de virulencia presentes en las OMVs de las tres cepas..... | 127 |
| 16.18 | Participaciones académicas..... | 128 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Tipos de vésiculas de membrana externa (OMVs) y su composición generadas a diferentes tiempos..... | 26 |
| Tabla 2. Características de los grupos de ratones BALB/c (n=5) inmunizados..... | 35 |
| Tabla 3. Identificación de proteínas presentes en común (124 proteínas) en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003..... | 51 |
| Tabla 4. Proteínas con un peso molecular $\geq 15,000$ pero $\leq 20,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003..... | 56 |
| Tabla 5. Proteínas con un peso molecular $\geq 30,000$ pero $\leq 37,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003..... | 56 |
| Tabla 6. Proteínas con un peso molecular $\geq 40,000$ pero $\leq 50,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003..... | 57 |
| Tabla 7. Proteínas con un peso molecular $\geq 70,000$ pero $\leq 110,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003..... | 57 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Lista de patógenos bacterianos prioritarios..... | 15 |
| Figura 2. Representación de los fenotipos de <i>K. pneumoniae</i> | 17 |
| Figura 3. Mecanismos de patogenicidad de <i>K. pneumoniae</i> en pulmón..... | 17 |
| Figura 4. Mecanismos de patogenicidad de <i>K. pneumoniae</i> en tracto gastrointestinal..... | 18 |
| Figura 5. Factores de virulencia presentes en <i>K. pneumoniae</i> | 23 |
| Figura 6. Mecanismos de evasión inmune de <i>K. pneumoniae</i> | 24 |
| Figura 7. Esquema de inmunización-sangrado de los seis grupos de ratones BALB/c..... | 36 |
| Figura 8. Micrografías por Microscopía Electronica de Transmisión (TEM) de las OMVs del aislado clínico KpBUAP021..... | 40 |
| Figura 9. Micrografías por Microscopía Electronica de Transmisión (TEM) de las OMVs del aislado clínico KpBUAP003..... | 45 |
| Figura 10. Concentración proteica en las OMVs de <i>K. pneumoniae</i> por el método de Bradford..... | 43 |

| | |
|---|----|
| Figura 11. Promedio de los sueros obtenidos en cada semana de inmunización. | 45 |
| Figura 12. Gráficos de los títulos de anticuerpos generados en cada grupo murino a lo largo del esquema de inmunización..... | 46 |
| Figura 13. Gráficos de los isotipos de anticuerpos | 47 |
| Figura 14. Análisis del proteoma de las OMVs de las tres cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 49 |
| Figura 15. Rutas o mecanismos bacterianos, donde las proteínas presentes en las OMVs de las tres cepas están involucradas..... | 50 |
| Figura 16. SDS-PAGE representativo de los extractos proteicos de <i>K. pneumoniae</i> | 55 |
| Figura 17. Western Blot de los extractos proteicos de <i>K. pneumoniae</i> utilizando los anticuerpos anti-OMVs | 59 |
| Figura 18. Evaluación de la inmunogenicidad de las posibles proteínas observadas en el bandeo del Western Blot con los anticuerpos anti-OMVsATCC y anti-OMVs021 | 60 |
| Figura 19. Análisis de inmunofluorescencia de las OMVsATCC y KpATCC700603 | 62 |
| Figura 20. Análisis de inmunofluorescencia de las OMVs021 y KpBUAP021 | 63 |
| Figura 21. Análisis de inmunofluorescencia de las OMVs003 y KpBUAP003..... | 64 |
| Figura 22. Perfil de sensibilidad de KpATCC700603 a antibióticos..... | 67 |
| Figura 23. Perfil de sensibilidad de KpBUAP021 a antibióticos..... | 68 |
| Figura 24. Perfil de sensibilidad de KpBUAP003 a antibióticos..... | 69 |
| Figura 25. Perfil de sensibilidad de <i>Citrobacter freundii</i> a antibióticos..... | 70 |
| Figura 26. Evaluación de la movilidad bacteriana en presencia de anticuerpos anti-OMVs purificados..... | 71 |
| Figura 27. Placas de los ensayos de movilidad bacteriana en agar blando al 0.3% en presencia de anticuerpos anti-OMVs purificados | 72 |
| Figura 28. Determinación de la actividad bactericida de los anticuerpos anti-OMVs en <i>K. pneumoniae</i> | 74 |
| Figura 29. Clasificación de las MV de acuerdo a su biogénesis y composición.... | 75 |

Resumen

K. pneumoniae es un patógeno emergente clasificado dentro del grupo ESKAPE, conocido por su resistencia a múltiples antibióticos y su capacidad para causar Infecciones Asociadas a la Atención médica (IAAS). A través de la inmunización con OMVs, se ha demostrado que los sueros hiperinmunes producen anticuerpos que no solo facilitan la opsonización, sino que también potencian la actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias gram-negativas, ya que los anticuerpos anti-OMVs son capaces de eliminar la bacteria del hospedero, proporcionando un enfoque innovador para el tratamiento de infecciones resistentes.

La presente tesis investiga la respuesta inmune humoral generada por las vesículas de membrana externa (OMVs) purificadas de *Klebsiella pneumoniae* (Kp) y su relación con su patogenicidad posterior a la interacción de los anticuerpos anti-OMVsKp. Se llevó a cabo la purificación y caracterización proteica de OMVs de tres cepas de *K. pneumoniae* (KpBUAP021, KpBUAP003 y KpATCC700603). La cuantificación de proteínas presentes en las OMVs se realizó utilizando el método de Bradford asegurando la concentración del material utilizado para la inmunización en modelos murinos (BALB/c). Se realizó la titulación de anticuerpos anti-OMVsKp y su isotipificación, contribuyendo a comprender mejor la respuesta inmune generada por las OMVs de *K. pneumoniae*. Los anticuerpos fueron utilizados para ensayos de susceptibilidad a antibióticos, movilidad, inmunofluorescencia y actividad bactericida frente a las tres cepas de *K. pneumoniae*.

La caracterización y purificación de las OMVs utilizadas en la inmunización de modelos murinos (BALB/c) corroboran su potencial como inmunógenos. Además, los anticuerpos anti-OMVs presentan una actividad bactericida frente a la bacteria, aumentando su eliminación por parte del complemento, pero en ambientes con antibióticos su supervivencia es diferente.

Se requiere de estudios adicionales para optimizar la generación de anticuerpos anti-OMVs y su combinación con agentes complementarios, con el fin de maximizar su eficacia y reducir los casos altos de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS).

1 Introducción

1.1 Enterobacterias

El médico alemán Robert Koch, ganador del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1905, fue autor de los primeros experimentos que demostraron que cada especie bacteriana causa una enfermedad infecciosa específica, desarrollando una metodología para cultivar, multiplicar y aislar bacterias, actualmente conocida como los “Postulados de Koch” (De Kruif, 1926).

La principal familia de bacterias causantes de diversas infecciones en el humano, y por tanto la más estudiada es *Enterobacteriaceae*, descrita por primera vez por Rahn en 1937, consistía de un solo género, *Enterobacter*, pero fue hasta 1939 que se empezó a utilizar en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (Haupt, 1957). Desde 1988 la composición de esta familia incluía géneros como *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, ***Klebsiella***, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rhanella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Tatumella*, *Yersinia* y *Xenorhabdus* (Jones, 1988); actualmente, la familia se conforma de 68 géneros y 355 especies (Janda y Abbott, 2021).

Dentro de las características de esta familia, también llamadas, enterobacterias, se encuentra su diámetro de 0.3 a 1.5 micrómetros, forma recta, oxidasa negativa (con algunas excepciones), antígeno enterobacterial (excepto *Erwinia chrysanthemi*), y no requieren sodio, nicotinamida adenina ni nitrógeno orgánico para su crecimiento (aunque existen excepciones) (Brenner y Farmer, 2015).

1.2 Definición de infección

El cuerpo humano puede pasar de un estado saludable a enfermo debido a una enfermedad infecciosa, ocasionando la destrucción de células, la activación del sistema inmune y, en casos graves, la muerte; causadas por la presencia de enterobacterias (Salosensaari *et al.*, 2021). Existen factores de riesgo que esta familia bacteriana puede aprovechar, como es: la edad, comorbilidades en el

hospedero y por supuesto, sus propios mecanismos de patogenicidad donde se incluyen factores de virulencia; de tal forma, estos patógenos se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad para generar enfermedad en personas sanas (patógenos primarios) o en personas inmunodeficientes o inmunocomprometidos (patógenos oportunistas) (Guerrero *et al.*, 2014).

Los factores de virulencia de las enterobacterias son un componente importante para llevar a cabo con éxito el desarrollo de una enfermedad infecciosa, entre los que destacan: endotoxinas, enterotoxinas, fimbrias tipo IV, sistemas de secreción tipo III, factores inhibidores y destructores de linfocitos, adhesinas, factores de colonización, proteasas, catalasas, etc (Lopardo *et al.*, 2016).

1.3 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos en las enterobacterias se debe a su capacidad de desarrollar diversos mecanismos de resistencia ante estos componentes, que se pueden encontrar en su ambiente natural o bien por el uso indiscriminado de estos antibióticos, favoreciendo la aparición de enterobacterias multidrogorresistentes. Colavecchio y colaboradores demostraron en 2017, que los bacteriófagos también contribuyen al desarrollo de la resistencia a antibióticos por medio de la transducción, que colabora en la transferencia horizontal de genes y, por lo tanto, en los mecanismo de resistencia; los más fundamentales para las enterobacterias son la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE, por sus siglas en inglés) mediadas por plásmidos y enzimas hidrolíticas de carbapenémicos (CRE, por sus siglas en inglés) (Pitout, 2008; Briongos *et al.*, 2012; Pachay, 2018; Fariñas y Martínez, 2013), mutaciones en las enzimas blanco, bombas de eflujo, modificación en la permeabilidad de su membrana y en algunos casos la formación de biopelículas (Azargun *et al.*, 2020; De Oliveira *et al.*, 2020).

1.4 Importancia clínica a nivel mundial

La alta prevalencia de enterobacterias multidrogorresistentes en el mundo es alarmante, dado que países como Egipto, Tailandia, Paquistán e India tienen

porcentajes superiores al 30% en enterobacterias resistentes a CRE (Tilahun *et al.*, 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS), actualizó este año (2024) la lista de patógenos prioritarios (Figura 1), donde las enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y resistentes a carbapenémicos se encuentran en el grupo crítico.

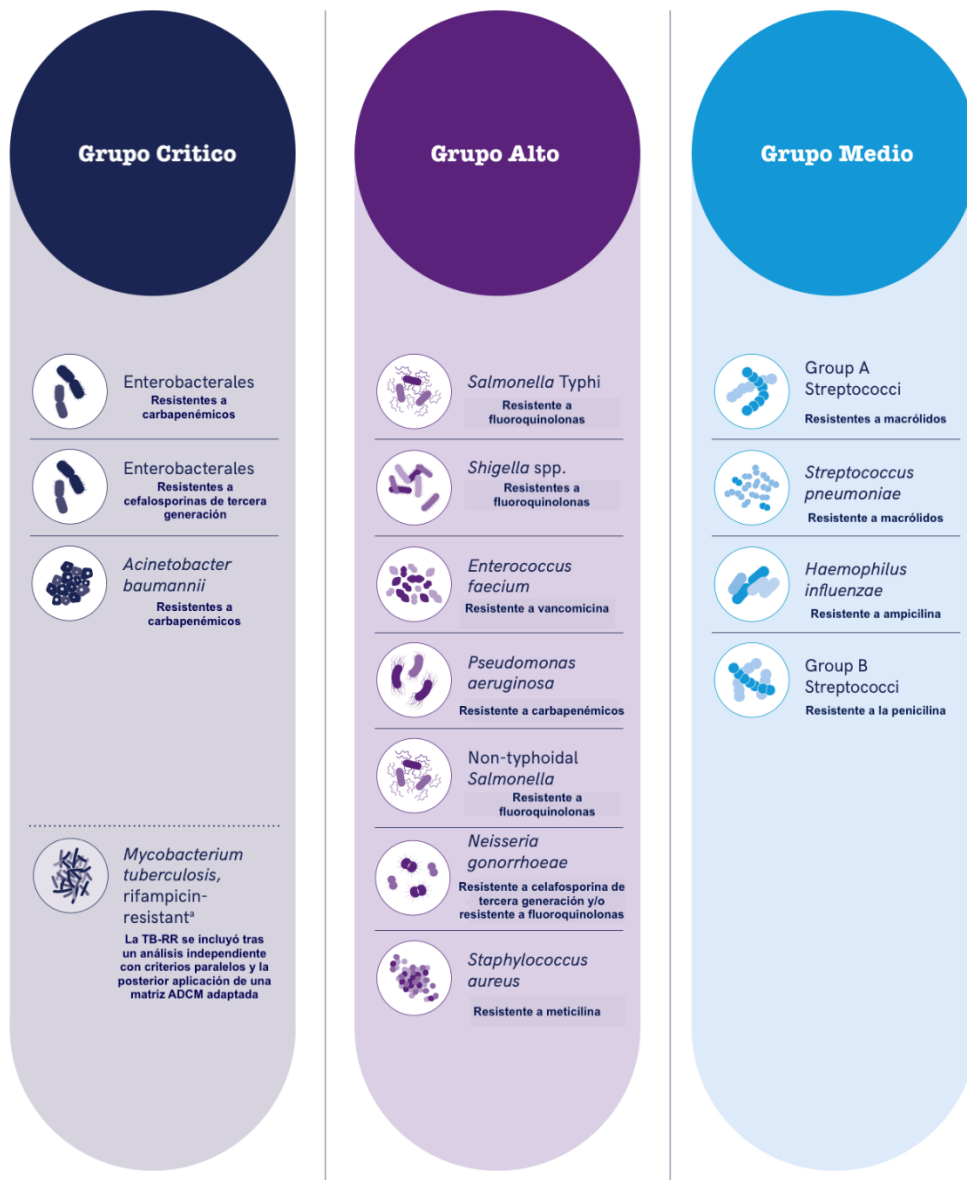


Figura 1. Lista de patógenos bacterianos prioritarios. Modificada de OMS, 2024

2 Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)

De acuerdo con la OMS, las IAAS son aquellas infecciones que un paciente puede contraer durante su estancia en un hospital o centro sanitario, pero la cual no tenía ni estaba incubando al momento de su ingreso; pueden aparecer incluso después del alta del paciente. A este tipo de infección anteriormente se les denominaban como infecciones nosocomiales o intrahospitalarias; con más de 1.4 millones de personas contagiadas a nivel mundial, es decir, al menos un 5% de los pacientes pueden desarrollar un tipo o más de IAAS.

Dentro de este tipo de infecciones se encuentran infecciones del torrente sanguíneo asociada a la línea central (CLABSI), infecciones del tracto urinario asociadas al catéter (CAUTI), infección del sitio quirúrgico (SSI), neumonía asociada al ventilador (VAP) (CDC, 2014), es importante mencionar que actualmente México cuenta con un manual sobre el manejo, prevención y vigilancia de este tipo de infecciones, con el propósito de disminuir el número de casos de IAAS en las unidades de atención médica y mejorar la calidad de atención en los pacientes de las Instituciones del Sistema Nacional de Salud (Secretaría de Salud, 2019).

En el reporte de casos de IAAS a nivel nacional y mundial, se destaca el gran problema a nivel hospitalario y económico, ya que tan solo en México, la Secretaría de Salud emite cada año la distribución de los microorganismos identificados en las IAAS, dentro de los que destacan: *Acinetobacter baumannii* MDR, *Pseudomonas aeruginosa* MDR, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, ***Klebsiella pneumoniae***. Para este último microorganismo, en 2021 se reportó como *K. pneumoniae* BLEE, KPC (Productora de carbapenemasas) y cKp.

3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una enterobacteria, gram-negativa, considerada la especie de mayor relevancia clínica del género *Klebsiella* debido a que desempeña un papel importante como causante de enfermedades infecciosas oportunistas, como son las IAAS; aislada por primera vez en 1882 a partir de tejido pulmonar de pacientes con neumonía fibrinosa genuina aguda (Friedländer, 1882).

3.1 Fenotipo

Existen diversos fenotipos descritos para *K. pneumoniae* (Figura 2), que se basan en características específicas que pueden influir en su patogenicidad, resistencia a los antibióticos y su capacidad de evadir el sistema inmune; desde los resistentes a antibióticos (AMR), multidrogosresistentes (MDR), extremadamente resistente a los medicamentos (XDR), hipercapsular, hipermucoide (HMV), hipermucoviscoso, hipervirulenta (hvKp) y el fenotipo clásico (cKp).

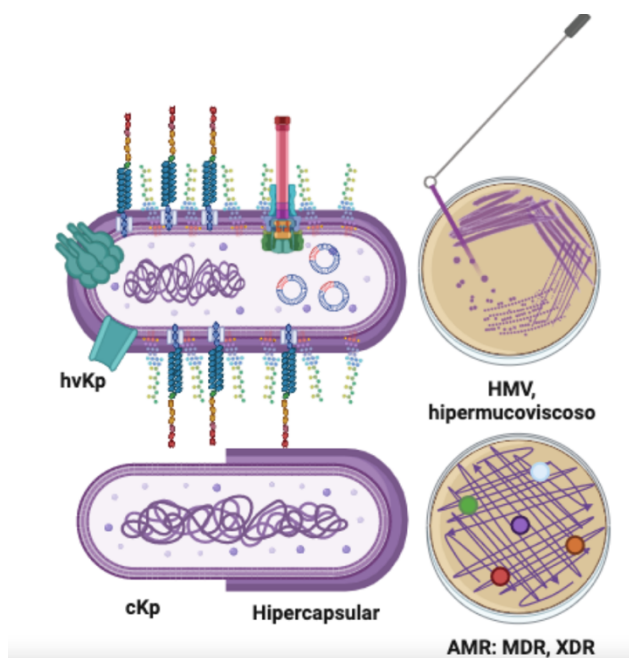


Figura 2. Representación de los fenotipos de *K. pneumoniae*. Creación propia con BioRender

El fenotipo HMV se considera emergente y necesario para la colonización de *K. pneumoniae* en pacientes inmunocomprometidos (Lin *et al.*, 2011). En tanto, el fenotipo HMV puede sonar alarmante, en realidad, existen dos fenotipos que preocupan: el fenotipo AMR, que incluye a MDR y XDR. En Australia, Gorrie y colaboradores (2022) lograron identificar la frecuencia de *K. pneumoniae* en pacientes hospitalizados, siendo de un 21.3% para MDR a tres categorías de antibióticos y vale la pena decir que el 16% de los pacientes tenían una cepa resistente a cefalosporinas de tercera generación. El fenotipo hvKp, que puede ser transmitido por medio de plásmidos, ocasiona brotes en una población debido a la rápida propagación de genes de virulencia (Gu *et al.*, 2018). Es crucial mencionar

que el fenotipo hipermucoviscoso es una variante de hvKp y no siempre se puede relacionar con el desarrollo de una enfermedad infecciosa, dado que el fenotipo cKp también puede tener esta característica (Catalán *et al.*, 2017).

3.2 Colonización

Pacientes hospitalizados en cuidados intensivos pueden presentar una infección por *K. pneumoniae* y del 50 al 80% pueden terminar en una enfermedad infecciosa, que se puede evitar por medio de un monitoreo de este tipo de cepas (Rao *et al.*, 2021; Russo y Marr, 2019). Por ende, la colonización y crecimiento por *K. pneumoniae* comienza por la adquisición y transporte gastrointestinal en pacientes, siendo este último un intermediario para preservar a la bacteria dentro del hospital (Selden *et al.*, 1971). El ingreso de *K. pneumoniae* implica diversas frecuencias de colonización, asociadas al tipo de población de su hospedero; y de esto depende el desarrollo de enfermedades crónicas del tracto gastrointestinal e infecciones del tracto urinario, neumonía, en el sitio quirúrgico y sepsis en casos graves (Lam *et al.*, 2021), pero lo anterior depende mucho de la colonización extraintestinal multisitio, los procedimientos invasivos, el uso de antibióticos como cefalosporina y fluoroquinolonas, así como la colonización rectal (Falcone *et al.*, 2022) la cual no está tan clara en cuanto a de su prevalencia o duración, específicamente las cepas ST307 y ST147, que en humanos es diferente (Peirano *et al.*, 2020).

Establecido lo anterior, los factores implicados en el desarrollo de una enfermedad infecciosa dependen del éxito de colonización que *K. pneumoniae* logre en su hospedero, en específico superficies epidérmicas y mucosas. Para una correcta colonización, la bacteria requiere de colibactina, microcina E492 y salmoquelina en cepas hvKp y así lograr una ventaja en el ambiente (Russo y Marr, 2019). Otro factor que influye en la colonización es el transportador de péptidos antimicrobianos, ya que mejora la adherencia a las células epiteliales intestinales y afecta los niveles transcripcionales de otros genes como los genes de fimbrias tipo I (Hsu *et al.*, 2019). Respecto a los genes cruciales para este proceso, *treC* y *celB*, están implicados en la utilización de trehalosa y en el transporte de celobiosa al

citoplasma respectivamente, y al mismo tiempo se relacionan con la producción de cápsula y biopelículas; factores importantes en la colonización intestinal y del colon (Wu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012).

3.3 Infección

La vía de entrada que utilice *K. pneumoniae* influye en la infección a desarrollarse, por ejemplo: una infección de neumonía depende de la colonización en el tracto respiratorio; una infección del tracto urinario depende de una colonización perineal o del colon (Shon *et al.*, 2013). Estas vías pueden depender del tipo de instrumento médico usado en el paciente, los cuales pueden ser: incisiones quirúrgicas, tubos endotraqueales y catéteres (Gu *et al.*, 2018).

La principal cepa identificada en el desarrollo de infecciones sistémicas, adquiridas e infecciones graves en piel y tejido blando en personas sanas es la *K. pneumoniae* hvKp y en contraste, la cepa causante de infecciones urinarias, neumonías, nosocomiales graves y bacteremias primarias y secundarias son las cepas cKp (Paczosa y Meccas, 2016). Dentro de los síntomas característicos de estas infecciones se encuentran: la producción de mucosidad espesa teñida de sangre, disuria, aumento en la frecuencia de la micción, hematuria, abscesos hepáticos, pulmonares, en el cuello o en los riñones, celulitis, fascitis necrosante, miositis, y endoftalmitis (Blue *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2010; Zammit *et al.*, 2014).

3.4 Mecanismos de patogenicidad

Dependiendo del sitio anatómico colonizado por *K. pneumoniae*, se pueden identificar diferentes mecanismos de patogenicidad. Por ejemplo, en los neumocitos (Figura 3), esta bacteria requiere la presencia de plásmidos como pLVPK y genes como *rcaB* y *kvrAB* que aumentan la mucoviscosidad y producción de cápsula en el fenotipo hvKp. Además, necesita un factor transcripcional (*rfaH*), relacionado con la síntesis de aminoácidos esenciales por *aroE*, *ilvC* y *ilvD* y un transportador de sideróforos (*FepB*) para captar enterobactina, aerobactina, yersiniabactina y salmoquelina. Estos factores contribuyen a la diseminación y colonización de *K.*

pneumoniae, que aunado a su producción de biofilm, hacen que su invasión sea tan severa y persistente (Joshep *et al.*, 2021).

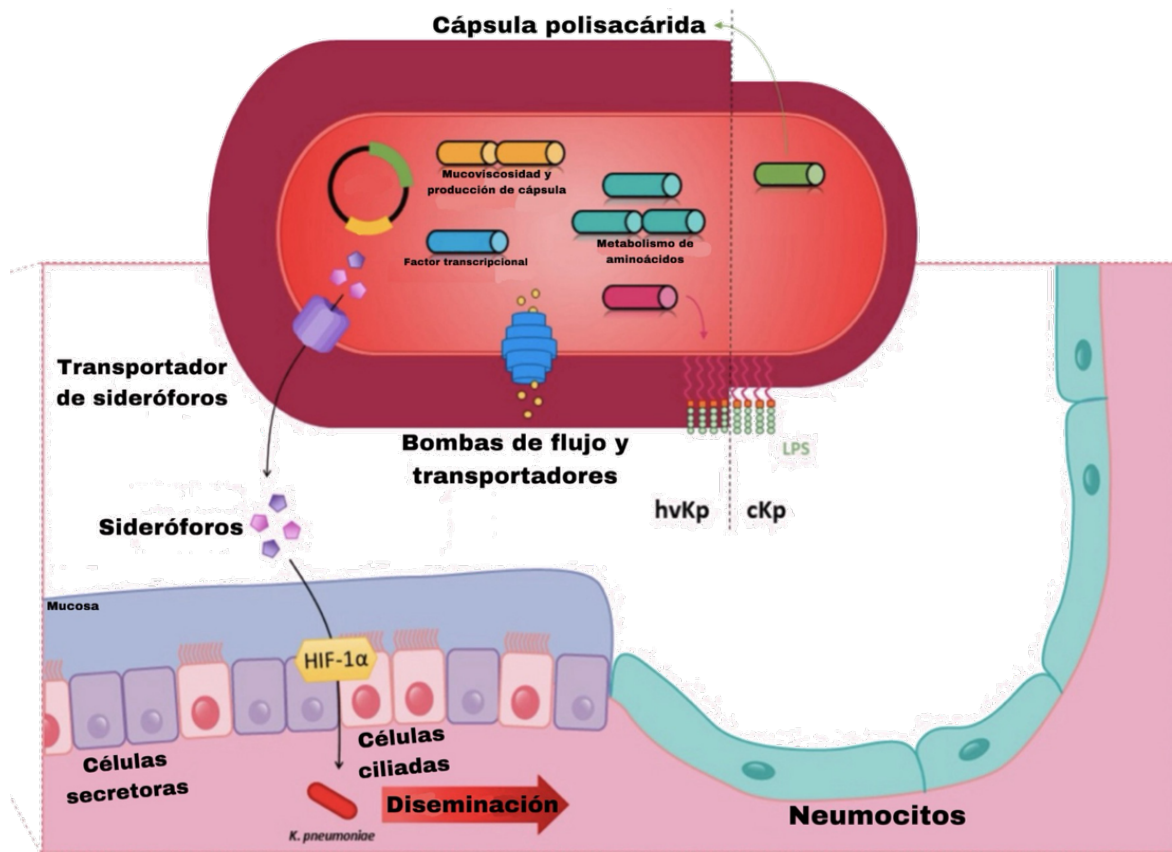


Figura 3. Mecanismos de patogenicidad de *K. pneumoniae* en pulmón. Modificada de Joshep *et al.*, 2021

En el tracto gastrointestinal (Figura 4), *K. pneumoniae* supera el efecto barrera de la microbiota natural y utiliza los mecanismos de adhesión y reordenamiento del citoesqueleto para su translocación intracelular a través del secuestro de las vías de señalización PI3K/Ake (Hsu *et al.*, 2015), que al contar con genes de resistencia a sales biliares y al estrés ácido como *cad* y *tdc*, daña a las células epiteliales, ocasionando una inflamación intestinal por medio de los transportadores de péptidos (Sap) y enzimas con actividad lisina descarboxilasa (Cad) (Joshep *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2021).

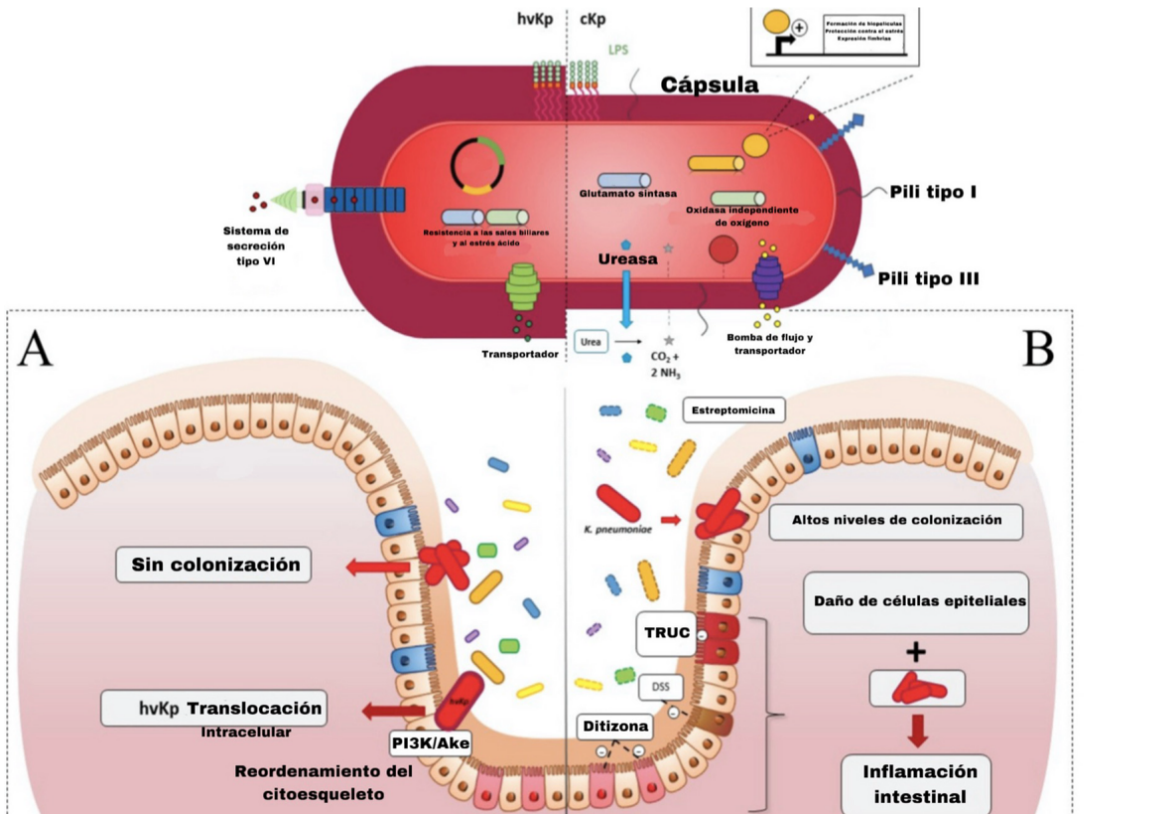


Figura 4. Mecanismos de patogenicidad de *K. pneumoniae* en tracto gastrointestinal.
Modificada de Joshep *et al.*, 2021

3.4.1 Movilidad

K. pneumoniae no es típicamente móvil como el caso de las bacterias flageladas, sin embargo, se sugiere que puede tener componentes genéticos que podrían permitir una forma limitada de movimiento en un ambiente clínico (Chmelnitsky *et al.*, 2013), donde se presentan cepas resistentes a carbapenémicos con proteínas relacionadas con fimbrias, pilis y flagelos (Sharma *et al.*, 2019). Así mismo se ha demostrado que ciertas cepas son capaces de tener un flagelo polar que le permite tener una movilidad tipo “swarming” (Carabarin *et al.*, 2016).

3.5 Factores de virulencia

Los factores de virulencia (Figura 5) entre las diferentes cepas de *K. pneumoniae* son la síntesis de lipopolisacárido (LPS), captación y transporte de hierro, cápsula, pili tipo I y III, bombas de expulsión, el sistema de secreción tipo VI y la toxina

colibactina (Effah *et al.*, 2020; Martin y Bachman, 2018, Strakova *et al.*, 2021, Piperaki *et al.*, 2017).

Lo factores mejor estudiados son los plásmidos de virulencia que contienen genes *iuc*, biosintéticos para el sideróforo aerobactina; *peg*, transportador metabólico; genes *rmpA* y *rmpA2* e *iro*; los genes anteriores pueden llegar a integrarse al cromosoma (Struve *et al.*, 2015), por ende, es posible decir que estos factores se pueden encontrar en el genoma central o en el accesorio.

La síntesis de lipopolisacárido, específicamente el antígeno O, es de consideración, pues está relacionado con la supervivencia posterior a la invasión del hospedero; existen 11 antígenos identificados, de los cuales, los antígenos O1 al O3 y O5, están mayormente en casos clínicos, específicamente en un 98% (Assoni *et al.*, 2021).

Se han identificado dos factores destacados de virulencia: en la década de 1960, la secreción de vesículas de membrana externa (OMVs), capaces de inducir respuestas inmunes, evadir el sistema inmune, favorecer el transporte de biomoléculas importantes para *K. pneumoniae* (Jan, 2017), lo cual se discutirá más adelante; y en el año 1940, la proteína de la familia de la fosfolipasa D (PLD1), ubicada dentro del sistema de secreción tipo VI, involucrada en la composición lipídica de la membrana de *K. pneumoniae* (Lery *et al.*, 2014).

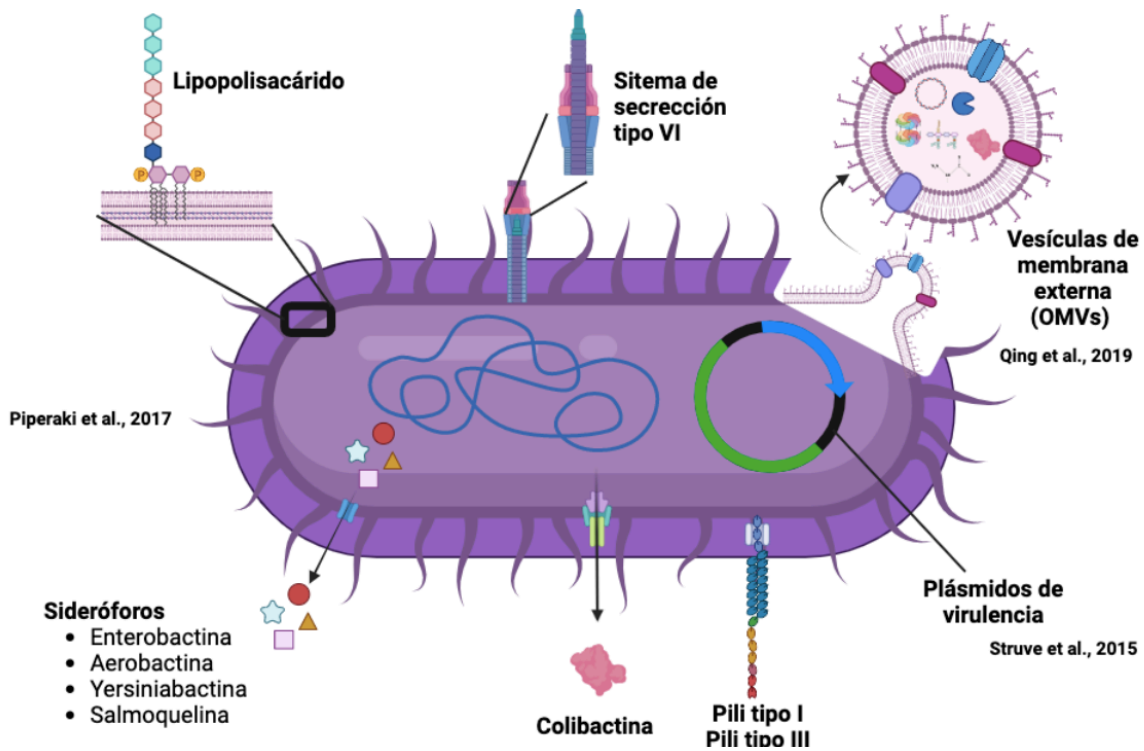


Figura 5. Factores de virulencia presentes en *K. pneumoniae*. Imagen propia creada en BioRender.

3.6 Respuesta del sistema inmune

El sistema inmune innato (Figura 6), particularmente, el complemento, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNL) y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), son fundamentales para la protección de una infección bacteriana; sin embargo, la cápsula le ayuda a *K. pneumoniae* a evadir el sistema inmune del hospedero, dado que le brinda protección contra la acción del suero (anticuerpos y complemento) y la opsonofagocitosis (Martín y Bachman, 2018) y las bombas de expulsión evitan la acción de los péptidos antimicrobianos naturales del hospedero (Padilla *et al.*, 2010, Gomez & Uhlemann, 2017).

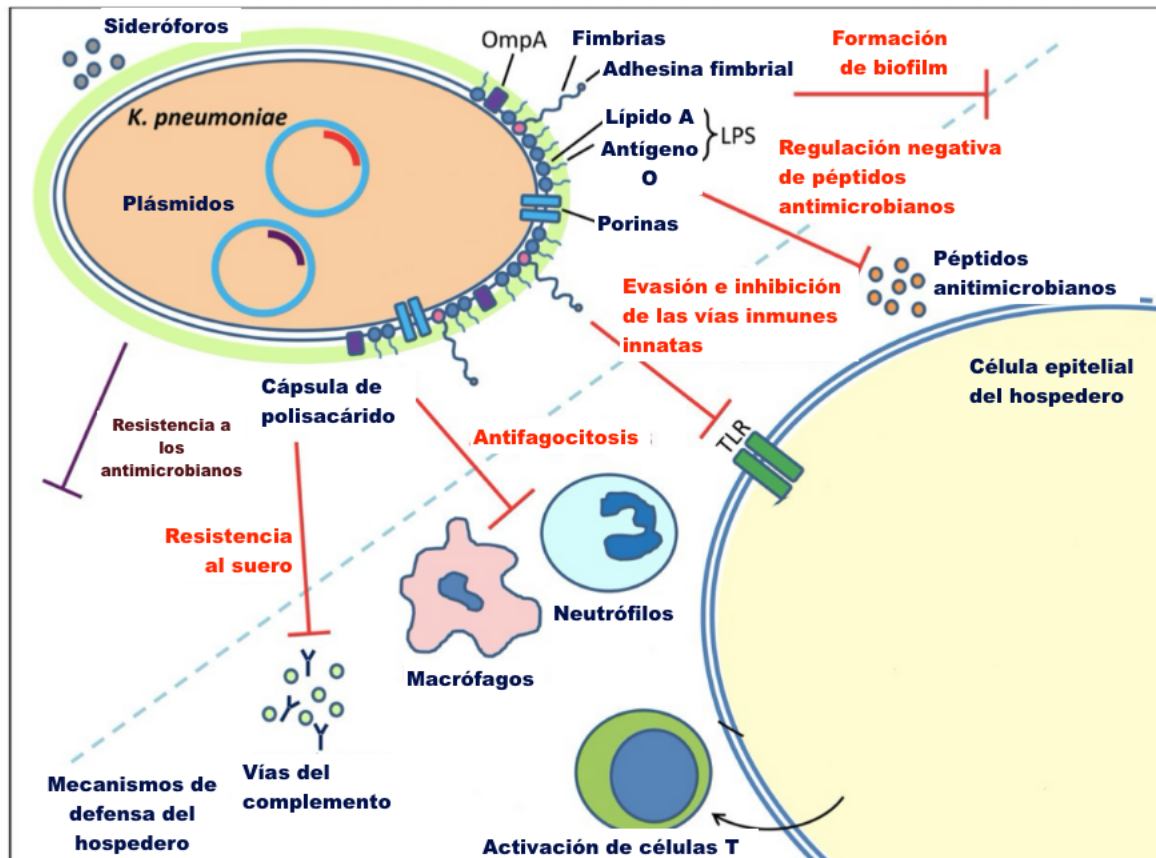


Figura 6. Mecanismos de evasión inmune de *K. pneumoniae*. Modificado de Gomez & Uhlemann, 2017

Bengoechea y Pessoa en 2018 destacan que *K. pneumoniae* tiene interacciones con los neutrófilos, monocitos, células dendríticas y células epiteliales que activan diferentes citocinas (IL-8, IL-17, IL-22, IL-23), defensinas, lipocalicinas, citocinas proinflamatorias e interferones (IFN). Hablando específicamente, los fenotipos hvKp y cKp promueven la expansión de los monocitos antiinflamatorios, disminuyendo la lesión pulmonar al inicio de la infección; al mismo tiempo se ha descrito que *K. pneumoniae* es capaz de sobrevivir intracelularmente en los macrófagos, células iniciales que detectan y activan mediadores de respuestas inmunes, dando como resultado un fagosoma inmaduro y por ende una mayor mortalidad (Gonzales *et al.*, 2021). Por otro lado, las células linfoides innatas participan activamente en la neumonía por este patógeno (Xiong *et al.*, 2016).

3.7 Tratamiento

De acuerdo con la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) en 2024, el tratamiento de infecciones por bacterias Gram-negativas resistentes a los antimicrobianos incluyendo *Enterobacterales* productores de β -lactamasa de espectro extendido (ESBL-E), *Enterobacterales* productores de β -lactamasa AmpC (AmpC-E), *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (CRE), requiere un enfoque riguroso. Entre los antibióticos sugeridos se encuentran Amikacina, Ampicilina-sulbactam, Cefepime, Cefiderocol, Ceftazidima-avibactam, Ceftazidima-avibactam más aztreonam, Ceftolozano-tazobactam, Ciprofloxacino, Colistina, Eravaciclina, Ertapenem, Fosfomicina, Gentamicina, Imipenem-cilastatina, Imipenem-cilastatina-relebactam, Levofloxacino, Meropenem, Meropenem-vaborbactam, Minociclina, Nitrofurantoína, Plazomicina, Polimixina B, Sulbactam-durlobactam, Tigeciclina, Tobramicinam y Trimetoprim-sulfametoxazol; destacando la importancia de seleccionar tratamientos efectivos basados en las cepas clínicas. Por eso, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) participó en dos proyectos clave de vigilancia sobre la resistencia bacteriana en ambientes hospitalarios y plantas de tratamiento, destacando un aumento en la resistencia a los carbapenémicos en *K. pneumoniae*, recuperadas de muestras de sangre durante la pandemia por COVID-19; y tasas elevadas de resistencia en aislamientos de *Klebsiella spp.* a cefalosporinas y carbapenémicos en aguas residuales tratadas de hospitales (Secretaría de Salud, 2023). La estrategia nacional de acción contra la resistencia antimicrobiana (RAM) ha identificado una lista de antibióticos cruciales para la vigilancia de las IAAS, donde *K. pneumoniae* destaca como uno de los principales patógenos, los antibióticos relevantes para esta bacteria son: Cefotaxima, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Imipenem y Meropenem debido a su eficacia en el tratamiento (Secretaría de Salud, 2024).

4 *Vesículas de membrana externa (OMVs)*

Se ha demostrado que diversas bacterias Gram-negativas son capaces de secretar vesículas de membrana externa (OMVs) (Kim *et al.*, 2015), estructuras esféricas de

un tamaño aproximado de 20-250 nm, contienen componentes citoplasmáticos y del espacio periplasmático, así como proteínas de membrana externa (Grenier y Mayrand, 1987). Recientemente se han clasificado acorde a la composición proteica de las microvesículas (Tabla 1). Las OMVs permiten la comunicación intracelular y extracelular (Qing *et al.*, 2019), la regulación de la patogénesis bacteriana, debido a que liberan patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP), lípidos, proteínas y material genético que puede ser transferido horizontalmente a la célula hospedera (Dhital *et al.*, 2021); las OMVs de *E. coli* EHEC contienen diferentes factores de virulencia clave para su diseminación, ya que estas moléculas son fácilmente endocitadas (Bielaszewska *et al.*, 2017); y en *V. cholerae* las OMVs son ampliamente usadas para la liberación de la toxina colérica, pues está protegida de la degradación por las proteasas intestinales (Zingl *et al.*, 2021).

Tabla 1. Tipos de vesículas de membrana externa (OMVs) y su composición generadas a diferentes tiempos

| Tipo de microvesícula | Composición proteica | Tiempo (horas) | Bacteria | Referencia |
|---|----------------------|----------------|---|--------------------------------|
| *O-IMV **M-OMV | IM, CP, OM, PG | 16 | <i>Buttiauxella agrestis</i> | Takati <i>et al.</i> , 2020 |
| *O-IMV **M-OMV ***G-OMV | OM, P, IM, CP, EXT | 18 | <i>Escherichia coli</i> | Reimer <i>et al.</i> , 2021 |
| *O-IMV **M-OMV | OM, IM, CP | 16 | <i>Escherichia coli</i> | Aktar <i>et al.</i> , 2021 |
| OMV *O-IMV | OM, P, PM, CP, EXT | 15 | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> | Perez <i>et al.</i> , 2015 |
| OMV | OM, P, CP, EXT, CM | 10 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Suh <i>et al.</i> , 2024 |
| OMV *O-IMV | CP, OM, P, IM, EXT | 32 | <i>Pasteurella multocida</i> | Sun <i>et al.</i> , 2024 |
| OMV *O-IMV | OM, IM, P, EXT | 48 | <i>Tenacibaculum maritimum</i> | Escribano <i>et al.</i> , 2023 |
| *Vesículas de membrana externa-interna (O-IMV), **Vesículas multivesiculares multilamelares (M-OMV), Multicapa (> 3) (M-OMV), ***Encapsuladas agrupadas (G-OMV) Membrana interna (IM), Citoplasma (CP), Membrana externa (OM), Peptidoglicano (PG), Periplásmica (P), Extracelular (EXT), Membrana del citoplasma (CM) | | | | |

4.1 Funciones de las OMVs

Las OMVs pueden contribuir a la resistencia a antibióticos en las bacterias, propagando los genes de resistencia, dando como resultado la inhibición de la permeabilidad de la membrana, bombas de expulsión y enzimas inactivadoras de fármacos (Furuyama, N., & Sircili, M. P., 2021). Al mismo tiempo, la expresión de OMVs en la virulencia puede desempeñar un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria, modulando el sistema inmune del hospedero (Kulkarni y Jagannadham, 2014), por ejemplo, el uso de las OMVs de una bacteria determinada puede eliminar a su competidora natural, como es el caso de *P. gingivalis* y sus OMVs, ya que promueven que *S. aureus* sea internalizado en los neutrófilos del hospedero, así como permitir la agregación de estafilococos (du Teil Espina *et al.*, 2022); algo similar ocurre con las OMVs de *B. pertussis*, la principal toxina de esta bacteria (CyaA) está presente en las OMVs y esto ocasiona que los macrófagos tengan una menor actividad de defensa, aumentando la supervivencia bacteriana (Blancá *et al.*, 2022); por último, otra actividad inmune regulada por las OMVs es el caso de *B. fragilis*, siendo capaces de activar los receptores tipo Toll (TLR) 3, 4 y 7, así como la proteína 1 con el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD1) dando como resultado su internalización en la células epiteliales y liberando ARN bacteriano, así como peptidoglicano (Gilmore *et al.*, 2022)

En *K. pneumoniae* la secreción de microvesículas es poco conocido, sin embargo, diversos estudios plantean una transferencia horizontal de diversos plásmidos de resistencia a antibióticos mediados por las OMVs (Hua *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2023), entre ellos los genes KPC (Wang *et al.*, 2022; Dell'Annunziata *et al.*, 2021) y OXA-232 (Shen *et al.*, 2024); y el uso desmedido de estos fármacos antimicrobianos aumentan la producción y tamaño de estas estructuras (Jasim *et al.*, 2018), que a su vez inducen la expresión de genes de citocinas proinflamatorias (Lee *et al.*, 2012) y piroptosis en los macrófagos (Ye *et al.*, 2022), demostrando que las OMVs de *K. pneumoniae* provocan la activación de respuesta inmune específica (Martora *et al.*, 2019) abriendo la posibilidad del uso de los anticuerpos anti-OMVs como una posible terapia.

5 Modelo murino para la generación de anticuerpos por OMVs

5.1 Modelo BALB/c

Los ratones BALB/c son ampliamente utilizados para investigaciones sobre inmunología y enfermedades infecciosas. Una característica destacada de las cepas es su capacidad para producir anticuerpos policlonales (Azmi y Mohammad, 2019); ya que se ha demostrado que las reacciones inmunitarias están mediadas por las células T auxiliares de tipo 2 (Th2) y la producción de IL-4 para este tipo de modelos murinos en ciertas condiciones o bien una estimulación antigénica (Trunova *et al.*, 2011). Sin embargo, no siempre presentan respuestas Th2, ya que pueden generar respuestas Th1, incluyendo una alta producción de IFN- γ (Fukushima *et al.*, 2006), esto dependerá de la capacidad de inmunomodulación que presente un antígeno en particular.

5.2 Vía de inmunización para obtener antisueros policlonales

La inmunización es un proceso en el cuál el sistema inmune del hospedero es capaz de generar una respuesta específica a un antígeno externo. La inmunización activa implica la activación mediante una exposición para inducir respuestas inmunes humoral y celular; por el contrario la inmunización pasiva proporciona una protección mediante la transferencia de anticuerpos (Keystone *et al.*, 2018).

El método de inmunización está determinado por tres factores principales: el volumen, los componentes que acompañaran al inmunógeno y la velocidad de liberación en el sistema linfático. Si no se cumplen estos factores, se pueden presentar varios efectos secundarios: un volumen demasiado bajo puede resultar en una respuesta inmune inadecuada, mientras que un volumen excesivo podría causar reacciones adversas. Además, la presencia de contaminantes podría debilitar la respuesta inmune o provocar reacciones alérgicas. Por otro lado, si la velocidad de liberación del antígeno es demasiado rápida o lenta, la eficacia de la respuesta inmune puede verse comprometida, afectando la capacidad del sistema inmune para reconocer y combatir el antígeno. En ratones, las inyecciones de gran

volumen se administran por vía intraperitoneal, ya que permite asegurar una adecuada dispersión del antígeno y una respuesta inmunitaria efectiva (Greenfield, 2022).

5.3 Adyuvantes

Los adyuvantes no solo aumentan la respuesta inmune humoral y celular, sino que también ayudan a alcanzar un equilibrio óptimo entre eficacia y seguridad (Cameiro *et al.*, 2022). Los adyuvantes más utilizados (Freund) inducen una potente respuesta de células Th1, aumentando la producción de anticuerpos IgG2, pero si por el contrario se busca una respuesta Th2, se prefieren adyuvantes como el alumbre (generalmente en la forma de sales de aluminio), ya que promueven la producción de anticuerpos IgG1 e IgE (Goding, 1996).

TiterMax Gold es un adyuvante a base de aceite y surfactante, similar al adyuvante de Freund, pero este utiliza escualeno y un surfactante sintético no iónico que tiene una capacidad de unión a proteínas excelente; además tiene la capacidad de activar al complemento para ayudar a dirigir al antígeno hacia las células dendríticas, reduciendo así la necesidad de inyecciones de refuerzo (Cameiro *et al.*, 2022)

5.4 Modelo murino para *Klebsiella pneumoniae*

El modelo murino se ha empleado para la neumonía con el fin de evaluar la eficacia de una vacuna de *K. pneumoniae* inactivada. Este modelo ha demostrado la producción de IgG e IgM, que protegen contra la exposición por vía nasal o intraperitoneal de la bacteria (Cooper y Rowley, 1982). Además, el modelo murino se ha utilizado para evaluar formulaciones vacunales con lipopolisacárido, observándose una reducción en la carga pulmonar de *K. pneumoniae*, usando vías de administración intranasal e intramuscular, aunque se reportó cierto daño tisular (Martin y Bachman, 2018; van Duin y Paterson, 2020). En investigaciones adicionales, el uso de un modelo de ratón inmunocomprometido con inoculación intratraqueal de OMVs, resultó en una respuesta inflamatoria fuerte y patología

pulmonar significativa, así como la producción de citocinas por macrófagos (IL-1b, IL-8, IL-6), expresándose TNF α , factor estimulante de granulocitos y macrófagos (Lee *et al.*, 2012; Mantora *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2015).

6 Antecedentes

Se ha demostrado que existe una actividad antimicrobiana usando sueros hiperinmunes generados por la inmunización con OMVs de *P. aeruginosa* y existe una regulación positiva en la opsonización de la bacteria (Hadadi *et al.*, 2021), esta actividad también se observa en sueros anti-OMVs obtenidos de *S. typhi* y *S. paratyphi* (Howlander *et al.*, 2018). Por otro lado, los anticuerpos antimicrovésiculas producidos por la inmunización vía oral, pueden evitar la adhesión bacteriana de ETEC, disminuyendo la prevalencia bacteriana en el hospedero (Noroozi *et al.*, 2018). En estudios *in vivo* el suero de *B. parapertusis* de OMVs con LPS-O+ lograron eliminar a la bacteria de los pulmones de ratón; además el funcionamiento del sistema del complemento requiere de estos anticuerpos para la correcta eliminación de *B. parapertusis* (Bottero *et al.*, 2018).

7 Justificación

Klebsiella pneumoniae pertenece al grupo ESKAPE, grupo de seis patógenos con resistencia a antibióticos, incluidos en la lista de la OMS sobre las bacterias amenazantes para la salud pública. *K. pneumoniae* ha desarrollado diversos mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia gracias a la versatilidad de su genoma, por ello es uno de los nueve principales patógenos reportados en los casos de IAAS en el país, específicamente en un 5.90% durante el primer semestre de este año. Por otra parte, han emergido las OMVs como parte de factores de virulencia de esta bacteria, por lo consiguiente, el estudio de las OMVs de *K. pneumoniae* puede ser de utilidad para desarrollar una terapia universal con la finalidad de reducir la incidencia de infecciones por este bacilo, tal como los anticuerpos anti-OMVsKp. Teniendo en cuenta que se ha evidenciado que los

anticuerpos anti-OMVs impiden la colonización bacteriana con actividades bactericidas y opsonizantes contra patógenos específicos.

8 Hipótesis

La interacción de anticuerpos anti-OMVsKp de *Klebsiella pneumoniae* (generados en un modelo murino) con las OMVs y la bacteria completa ocasionará modificaciones en su patogenicidad debido al contenido presente en las OMVs purificadas.

9 Objetivo

Analizar la respuesta inmune humoral generada por las OMVs purificadas en un modelo murino y determinar su impacto en la patogenicidad de *Klebsiella pneumoniae*.

9.1 Objetivos particulares

- Purificar OMVs a partir de *K. pneumoniae*.
- Evaluar la respuesta inmune generada por las OMVs de *K. pneumoniae* en un modelo murino BALB/c.
- Identificar las proteínas inmunogénicas presentes en las OMVs de *K. pneumoniae*.
- Analizar la utilidad de los anticuerpos anti-OMVs en los mecanismos de patogenicidad y resistencia de *K. pneumoniae*; así como su relación con la patofisiología de la bacteria.

9.1.1 Objetivos específicos

- Cultivar en condiciones de estrés por antibiótico a los aislados clínicos de *K. pneumoniae* (KpBUAP003, KpBUAP021, KpATCC700603).
- Purificar las OMVs de *K. pneumoniae* mediante centrifugación diferencial y filtración en membranas de nylon.

- Identificar las OMVs por microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Cuantificar las proteínas presentes en las OMVs mediante el método de Bradford.
- Inmunizar ratones BALB/c con OMVs por vía intraperitoneal y obtener los sueros hiperinmunes.
- Cuantificar el título de anticuerpos anti-OMVs de *K. pneumoniae* mediante el método de ELISA.
- Determinar el isotipo de los anticuerpos anti-OMVs de *K. pneumoniae* por ELISA.
- Identificar el reconocimiento de *K. pneumoniae* y sus OMVs por los anticuerpos anti-OMVsKp mediante Inmunofluorescencia Indirecta.
- Analizar el perfil proteico de los extractos totales bacterianos y los extractos de OMVs de *K. pneumoniae*.
- Detectar proteínas inmunogénicas presentes en extractos proteicos totales de *K. pneumoniae* y sus OMVs a través de Western blot.
- Identificar las proteínas inmunogénicas posterior a un análisis mediante MALDI-TOF.
- Realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos en los aislados clínicos de *K. pneumoniae* tratados con los anticuerpos anti-OMVs.
- Analizar la actividad de movilidad tipo “swarming” de *K. pneumoniae* en placa posterior a la interacción con los anticuerpos anti-OMVsKp.
- Evaluar la actividad bactericida de anti-OMVs contra *K. pneumoniae* en una condición de ausencia y presencia de complemento (suero preinmune).

10 Materiales y métodos

10.1 Cultivo e inoculación de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*

Las cepas de *K. pneumoniae* utilizadas: **KpATCC700603** (cepa de referencia, productora de SHV-18), **KpBUAP021**(R:AM, PIP, AMC, CAZCTX, FEP, ATM, GM, S, AN, NN, CIP, TE, SXT; S: IMP, MEM, C, productora de SHV-2a) y **KpBUAP003**

(R: AK, productora de SHV); fueron cultivadas en 250 ml de medio líquido de Luria-Bertani (LB) suplementado con 40 µg/ml de ampicilina durante 36 horas a 37°C/180 rpm. Es importante destacar que las cepas usadas en este estudio fueron donadas por la Dra. Patricia Lozano Zaráin y pertenecen al repositorio del laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad (LMHyC) y presentan diferentes características que han sido estudiadas previamente en el laboratorio LMHyC; análisis recientes se encuentran disponibles en la Tesis de Campos, S. (2021).

10.2 Obtención y purificación de OMVs de KpATCC700603, KpBUAP003 y KpBUAP021

El proceso de purificación de las microvesículas (OMVs) se inició con el cultivo de las cepas en 250 ml de medio líquido de Luria-Bertani (LB) suplementado con 40 µg/ml de ampicilina durante 36 horas a 37°C/180 rpm y se continuó con la eliminación de las células bacterianas mediante centrifugación a 6000 rpm durante 50 minutos a 4 °C en la Centrifuga refrigerada *Centurion* PRO-K1015R. Subsecuentemente, los sobrenadantes fueron filtrados secuencialmente a través de membranas PVDF Durapore® (Merck Millipore) con tamaños de poro de 0.45 y 0.22 µm, con el propósito de eliminar bacterias residuales y restos celulares. La precipitación de las OMVs se llevó a cabo mediante el uso de acetona fría en un volumen de 1:2, recuperándolas y concentrándolas mediante Amicon® Ultra-15 10K (Merck Millipore) y centrifugación a 6000 rpm durante 40 minutos a 4 °C. El concentrado de aproximadamente 1 ml fue recuperado en tubos Eppendorf de 1.5 ml y centrifugado a 11,000 rpm por 5 min, la pastilla resultante de OMVs fue resuspendida en 300 µl de PBS estéril. Para verificar la esterilidad de las OMVs purificadas, se realizó una inoculación en placas de agar LB a 37°C durante 24 horas, y finalmente, las OMVs purificadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

10.3 Identificación de las OMVs

La técnica de microscopía electrónica de transmisión fue utilizada para la identificación de las OMVs purificadas, se siguieron los métodos previamente

descritos (González *et al.*, 2012). Las OMVs de KpBUAP021 y KpBUAP003 fueron fijadas utilizando glutaraldehído al 2.5% y posteriormente con tetraóxido de osmio al 1%, ambos en un tampón de cacodilato. Tras una deshidratación secuencial en etanol, las OMVs fueron embebidas en resinas epoxi. Las secciones delgadas resultantes se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL, modelo JEM-1011 de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGMP) del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE; CINVESTAV-Unidad Ciudad de México, México).

10.4 Cuantificación de proteínas presentes en las OMVs por el método de Bradford

Se generó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) utilizando concentraciones de 1, 2, 5, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/µl, empleando el método de Bradford. Estas concentraciones se aplicaron en una microplaca ELISA, y aparte se cargaron 5 µl de OMVs purificadas, a continuación, se añadieron 50 µl del reactivo de Bradford (SIGMA) y se incubó la mezcla durante cinco minutos a temperatura ambiente. Las lecturas se llevaron a cabo utilizando un lector de microplacas ELISA, Accuris SmartReader™ 96, modelo MR9600 (Accuris Instruments, USA).

10.5 Obtención de sueros preinmunes e inmunización en modelo murino (BALB/c)

El proyecto se sometió para su aprobación por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) para el uso de 30 ratones hembra BALB/c de 4-6 semanas de edad (n=5) con número de proyecto 100522577/UALVIEP-23/1, mismos que fueron criados y resguardados en las instalaciones del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, de acuerdo con los lineamientos establecidos en la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio”, a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a la Legislación Mexicana Vigente.

Se obtuvo el suero previo a la inmunización a partir de punción de la vena de la cola, posteriormente se centrifugó la sangre obtenida de los ratones a 5,000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el suero sanguíneo y se almacenó a -20°C hasta su uso.

El esquema de inmunización consistió en una inmunización y tres refuerzos cada siete días por vía intraperitoneal con 10 µg/ml de las OMVs purificadas emulsificadas 1:1 con adyuvante TiterMax Gold (Sigma-Aldrich). Se utilizaron dos grupos control con el mismo protocolo anterior, el primero fue PBS 1:1 con el adyuvante y el segundo PBS 1:1 con Agua Inyectable PiSA®. Es importante mencionar que se inmunizó un grupo únicamente con las OMVs (10 µg/ml) de KpBUAP021 para observar la activación específica de la respuesta inmune sin un adyuvante. Obteniendo seis grupos en total desglosados en la Tabla 2. Los ratones fueron sacrificados al término del esquema de inmunización después de la anestesia administrada de forma intraperitoneal de clorhidrato de xilazina (0.10 ml / 10 gr).

Tabla 2. Características de los grupos de ratones BALB/c (n=5) inmunizados.

| Grupo | Características | Siglas |
|--------------|---------------------------------|------------------|
| 1 | PBS + Agua Inyectable PiSA® | AI |
| 2 | PBS + Adyuvante TiterMax Gold | TM |
| 3 | 20 µg OMVs de KpATCC700603 + TM | OMVsATCC |
| 4 | 20 µg OMVs de KpBUAP021 + TM | OMVs021 |
| 5 | 20 µg OMVs de KpBUAP003 + TM | OMVs003 |
| 6 | 20 µg OMVs de KpBUAP021 + AI | OMVs021AI |

10.6 Obtención de sueros hiperinmunes

Se realizó un monitoreo de los suero hiperinmunes cada dos semanas (Figura 7) por medio de un corte en la parte terminal de la cola, la muestra sanguínea se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min y se almacenó el suero hiperinmune recuperado a -20° C para su posterior uso.

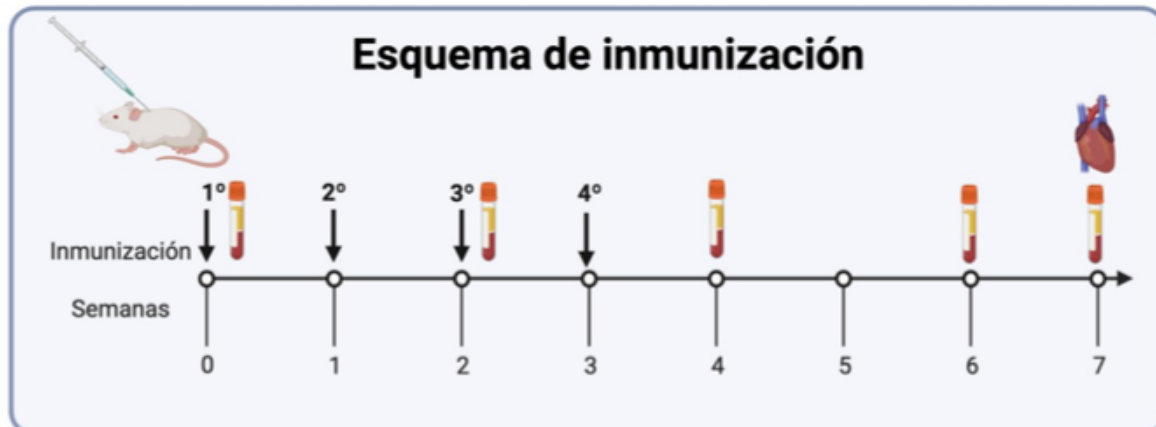


Figura 7. Esquema de inmunización-sangrado de los seis grupos de ratones BALB/c.
Imagen propia creada en BioRender.

10.7 Título de anticuerpos

ELISA: Inicialmente se realizó un pool de los sueros hiperinmunes de las semanas dos, cuatro, seis y siete; y de los sueros preinmunes de los ratones. A partir de estos se realizaron diluciones seriadas 1:100, 200, 400, 800, 1600, 3200 y 6,400 en BSA-Tween 1%.

Se adicionaron en una placa de ELISA de 96 pozos las OMVs de KpBUAP021, KpBUAP003, KpATCC700603 (2 µg /ml) a los pozos a experimentar (contemplando la serie de pozos blanco) y se incubó a 4° C durante 12 horas. Transcurrido el tiempo, se decantó y se realizaron seis lavados con PBS-Tween 0.05% (PBS-T) con el lavador de placas de Thermo Scientific Wellwash Versa. Se adicionó 200 µl de BSA al 2% a cada pozo y se incubó la placa a 37°C por 1 hora. Se decantó el contenido y se realizaron seis lavados con PBST. Se adicionaron cada una de las diluciones antes mencionadas, tanto para los sueros hiperinmunes como para los preinmunes. Para el pozo blanco se adicionaron 100 µl PBS. Se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente. Se decantó el contenido y se realizaron seis lavados. A cada pozo (contando los blancos) se adicionó el segundo anticuerpo, anti-ratón IgG (molécula entera)-peroxidasa producido en cabra (SIGMA) en dilución 1:3,000 en PBS. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Se decantó el contenido y realizaron seis lavados con PBST y 1 lavado con PBS. Por último,

se adicionó 100 µl de la solución del sustrato por pozo, 3,3', 5,5'- tetrametilbencidina (TMB) (SIGMA), se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura a una absorbancia de $\lambda=630\text{nm}$ en un lector de microplacas ELISA Accuris SmartReader™ 96, modelo MR9600 (Accuris Instruments, USA).

10.8 Isotipificación de anticuerpos

La isotipificación de los anticuerpos se realizó nuevamente a partir del pool de los sueros hiperinmunes de las semanas dos, cuatro, seis y siete; y de los sueros preinmunes de los ratones en una dilución 1:500 en BSA-Tween 1%. Se adicionaron en una placa de ELISA de 96 pozos las OMVs de KpBUAP021, KpBUAP003, KpATCC700603 (2 µg/ml) a los pozos a experimentar (contemplando la serie de pozos blanco) y se incubó a 4° C durante 12 horas.

Se determinaron las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM, evaluados mediante el método de ELISA, utilizando el kit Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (ISO2) de SIGMA acorde a las instrucciones del proveedor. Se adicionó el tercer anticuerpo, anti-cabra IgG (molécula entera)-peroxidasa producido en conejo (SIGMA) en dilución 1:3,000 en PBS. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Se decantó el contenido y realizaron seis lavados con PBST y 1 lavado con PBS. Se realizó la lectura a una absorbancia de $\lambda=630\text{nm}$ en un lector de microplacas ELISA Accuris SmartReader™ 96, modelo MR9600 (Accuris Instruments, USA).

10.9 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Se enviaron las OMVs purificadas de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003, con concentraciones proteicas de 16.95 µg/ml, 16.67 µg/ml y 16.10 µg/ml respectivamente al M. en C. Emmanuel Ríos Castro de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGMP) del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE; CINVESTAV-Unidad Ciudad de México, México) para su análisis en espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) y detector de iones (TOF). Los puntos se

analizaron con un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 Plus (ABSciex, Framingham, MA, EE. UU.). Los espectros MS/MS se obtuvieron por fragmentación de los iones precursores seleccionados utilizando Disociación Inducida por Colisión (CID) y se adquirieron mediante 3000 disparos con una intensidad láser de 3800. Los espectros MS/MS resultantes se compararon utilizando el software Protein Pilot v.2.0.1 (ABSciex, Framingham, MA, EE. UU.) (Barrera *et al.*, 2018).

10.10 Análisis bioinformático de las proteínas identificadas por proteómica

Para identificar las proteínas compartidas por las tres cepas, se realizó un diagrama de Venn en Venny <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> Oliveros, J.C. (2007-2015). Posteriormente de acuerdo con las proteínas compartidas se realizó un análisis de su función y clasificación en la plataforma de STRING (Szkarczyk *et al.*, 2019) https://version-12-0.string-db.org/cgi/input?sessionId=bpo429neLQNK&input_page_show_search=on y para su mayor comprensión se realizó otro diagrama de Venn en Deep Venn <https://doi.org/10.48550/arXiv.2210.04597> . Por último se realizó la búsqueda de la localización de las proteínas, las ruta metabólicas en la que están implicadas y el potencial inmunogénico en las plataformas de UniProt <https://www.uniprot.org/> , KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <https://www.genome.jp/kegg/> , BUSCA (Bologna Unified Subcellular Component Annotator) <https://busca.biocomp.unibo.it/>, VaxiJen v3.0 <https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen3/home/>; y se determinó la actividad moonlighting en las bases de datos Moon DB v 2.0 <http://moondb.hb.univ-amu.fr/index.php/> y MoonProt <http://www.moonlightingproteins.org/>.

10.11 Western blot en membranas de nitrocelulosa con los extractos totales bacterianos y de las OMVS

Los extractos proteicos totales bacterianos y de OMVs de KpBUAP021, KpBUAP003, KpATCC700603 se obtuvieron agregando un volumen de cultivo

fresco con la proporción de 1:1 con Urea 8 M y se incubo toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres ciclos de 5 s y 3 s de descanso en el Sonicador con Cabina SCIENTZ IDD.

Una vez listos los extractos proteicos totales se cuantificaron mediante Bradford y se migró una concentración proteica de 30 µg de los extractos proteicos totales bacterianos y 80 µg de extractos proteicos totales de OMVs, ¼ del volumen final de buffer de carga, 3 µl de BME, se llevaron a ebullición por 5 min a 95° C, los extractos se migraron en SDS-PAGE al 10% a 70 V durante 2 horas con Buffer Tris-Gli. Se tiñó con azul de Coomassie durante toda la noche a 100 rpm. Para visualizar las bandas, se realizó un desteñido del gel con una solución desteñidora (ácido acético al 15%, metanol al 50% diluidos en agua tridestilada).

Para el ensayo de Western blot, se utilizaron membranas de nitrocelulosa (Amersham) usando un sistema de transferencia húmeda (BioRad) a 70 V durante 1 hora, al finalizar se realizó el bloqueo con leche sin grasa al 10% a 100 rpm por 30 min a 37° C, al finalizar se realizaron tres lavados de 5 min con PBST al 0.05% de Tween 20, como primer anticuerpo se utilizaron los anti-OMVsKpBUAP021, anti-OMVsKpBUAP003 y anti-OMVsKpATCC a dilución 1:1,000 en PBS, se incubaron a 4° C durante toda la noche, nuevamente se realizaron tres lavados con PBST y como segundo anticuerpo se uso anti-ratón IgG (molécula entera)-fosfatasa alcalina producido en cabra (SIGMA) a 1:3,000 durante 1 hora a temperatura ambiente y 100 rpm. Se revelaron las bandas con 2 ml de sustrato fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitro azul de tetrazolio (BCIP®/NBT) (SIGMA) por 15 min en agitación.

10.12 Inmunofluorescencia de las OMVs y bacterias utilizando los anticuerpos anti-OMVs

Se colocaron 10 µl de un cultivo *overnight* de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 y 10 µl de OMVs en un portaobjetos con paraformaldehído al 4% por 30 min a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con PBS estéril y se realizó un aclarado con NH₄Cl 50 mM (Merk Millipore) durante 15 min. Antes de bloquear los portaobjetos nuevamente se lavo el portaobjetos con PBS y se

añadieron 50 µl de BSA al 2% por 30 min a 37°C. Se agregó 30 µl del primer anticuerpo (anti-OMVsKpBUAP021, anti-OMVsKpBUAP003 y anti-OMVsKpATCC) con una dilución de 1:1,000 y se dejó toda la noche a 4° C. Posteriormente se añadió el segundo anticuerpo acoplado a FITC en una dilución 1:2,500 por 2 horas a temperatura ambiente. Se concluyó con un lavado de PBS y el montaje con Vectashield® Antifade Mounting Medium with DAPI (H-1200-10) Vectro Laboratories, se cubrió con un portaobjetos y se selló con barniz para uñas. Se observó en microscopio de epifluorescencia (Motic). El análisis de las imágenes obtenidas se realizó mediante el software CellProfiler (<https://cellprofiler.org>) que particularmente es útil para cuantificar las señales.

10.13 Sensibilidad a antibióticos mediado por anticuepos anti-OMVs

Los antibiogramas disco-placa fueron realizados a partir de diluciones con turbidez 0.5 en la escala de Mc Farland de KpATCC700603, KpBUAP021, KpBUAP003 y *C. freundii*, como control de multidrogorresistencia (Anexo 1) con las siguientes variantes:

1. Interacción de los sueros de la semana 7 que contenían los anticuepos anti-OMVsKpBUAP021, anti-OMVsKpBUAP003 y anti-OMVsKpATCC a 120 rpm por 1 hora a temperatura ambiente con la suspensión bacteriana;
2. Como control negativo se empleo un cultivo de cada cepa con 0.5 de Mc Farland; Posteriormente se cultivaron en medio Mueller-Hinton (BD Bioxon) con un isopo estéril y de manera masiva; a continuación, se depositaron los sensidiscos Combi Disc Multidiscos para Gram Negativos (GN1) Antibióticos: NOR, AT, CTX, CRO, NA, NI, XM, GM, AK, CI, OF, CAZ, FIX, CD (Accutrack , S.A. De C.V) y se incubaron a 37° C por 16 hrs, al siguiente día se realizó la medición en milímetros de los halos de inhibición bacteriana y se analizó la susceptibilidad de acuerdo con el CLSI 2024.

10.14 Ensayo de la actividad de movilidad

Para evitar interferencias por el suero, se llevo a acabo la purificación de los anticuerpos con sulfato de amonio (Consultar anexo 2) de la semana 7 y se utilizaron en una dilución 1:400 (anti-OMVsKpBUAP021, anti-OMVsKpBUAP003 y anti-OMVsKpATCC) con PBS y se inactivaron a 45° C. Lo siguiente que se hizo fue tomar un cultivo de LB *overnight* de KpATCC700603, KpBUAP021, KpBUAP003, *E. coli* 2348/69 (Control positivo) y *E. coli* AGT01 (Control negativo), (para más información sobre los controles ver anexos 3 y 4), en una turbidez 0.5 de Mc Farland y se añadieron las diluciones para cada uno de los anticuerpos, dejando interaccionar por 30 min a 120 rpm a temperatura ambiente. La siembra de *Klebsiella* y los controles de *E. coli* se realizó por picadura central en placas de agar LB blando al 0.3%, se incubaron a 37° C durante 16 horas y se realizó el análisis de los halos de movilidad bacteriana.

10.15 Actividad bactericida de los anticuerpos

Se utilizaron placas de 12 pozos para evaluar la actividad bactericida de los anticuerpos anti-OMVsKpBUAP021, anti-OMVsKpBUAP003 y anti-OMVsKpATCC previamente purificados, en una dilución 1:50 con un cultivo de LB *overnight* de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 y 12.5 % de complemento tomado del suero preinmune de cada grupo. Es decir, en el pozo utilizado para la evaluación bactericida se colocaron 200 µl de cultivo bacteriano de las cepas de *Klebsiella*, 4 µl del anticuerpo homologa a su cepa, ej: anti-OMVsKpBUAP021 con KpBUAP021, y 26.5 µl de Complemento; en el pozo utilizado como control para el complemento solo eran 200 µl de cultivo y 26.5 µl de complemento (suero preinmune); por último, para el control negativo solo se colocaron 200 µl de cultivo bacteriano.

La actividad fue monitoreada por 40 min, es decir se tomaba 1 µl de cada pozo y se diluía hasta 1:100,000 para después plaquear 10 µl de esa dilución en placas de 12 pozos. Se incubaron por 16 horas y se realizó la cuantificación de CFU/ml.

10.16 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado en ensayos independientes y los resultados se expresan como la media \pm DE. Se realizó un análisis estadístico, para los ensayos requeridos, mediante la prueba Two Way ANOVA con el promograma Prism 10. Se considerarán las diferencias encontradas como estadísticamente significativas cuando el valor de $p=0.0332$ (*), $p=0.0086$ (**), $p=0.0010$ (***) y $p<0.0001$ (****).

11 Resultados

11.1 Identificación de las OMVs de los aislados clínicos de *K. pneumoniae*

Las OMVs de los aislados clínicos identificadas por TEM presentan un tamaño entre 20-170 nm con diferencias notables en su forma, específicamente las OMVs de KpBUAP021 (Figura 8) presentan tamaños desde los 41.98 hasta 170 nm, diferente contenido y cantidad de moléculas (Figura 8 A-C); así como doble (Figura 8 E,F,H) y triple membrana (Figura 8 G) que probablemente corresponda a la membrana plasmática (MP) o a una capa de peptidoglicano (PG) como se ha reportado en las OMVs de bacterias gram-negativas (Pérez *et al.*, 2015) y microvesículas parcialmente circulares. Por otro lado, las OMVs de KpBUAP003 (Figura 9) están en agrupaciones que presentan una morfología uniforme de aproximadamente $< 20-30$ nm, algunas aparentemente vacías (Figura 9 A,B) y otras presentan un cargo vesicular, además parecen estar atraídas unas a otras (Figura 9 C,D).

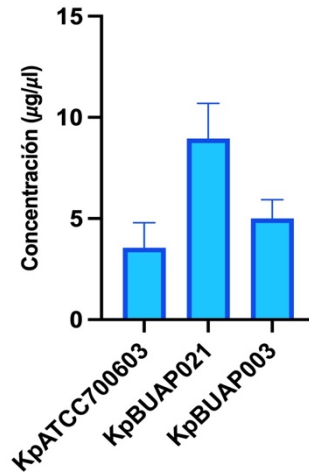


Figura 10. Concentración proteica en las OMVs de *K. pneumoniae* por el método de Bradford. Las barras de error indican la desviación estándar. Se realizaron tres experimentos independientes.

Las concentraciones de proteínas presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 (Figura 10) fueron de 3.55 µg/µl, 8.95 µg/µl y 5.0 µg/µl respectivamente en 300 µl de volumen final. Además, estas concentraciones fueron útiles para continuar con la inmunización en el modelo murino.

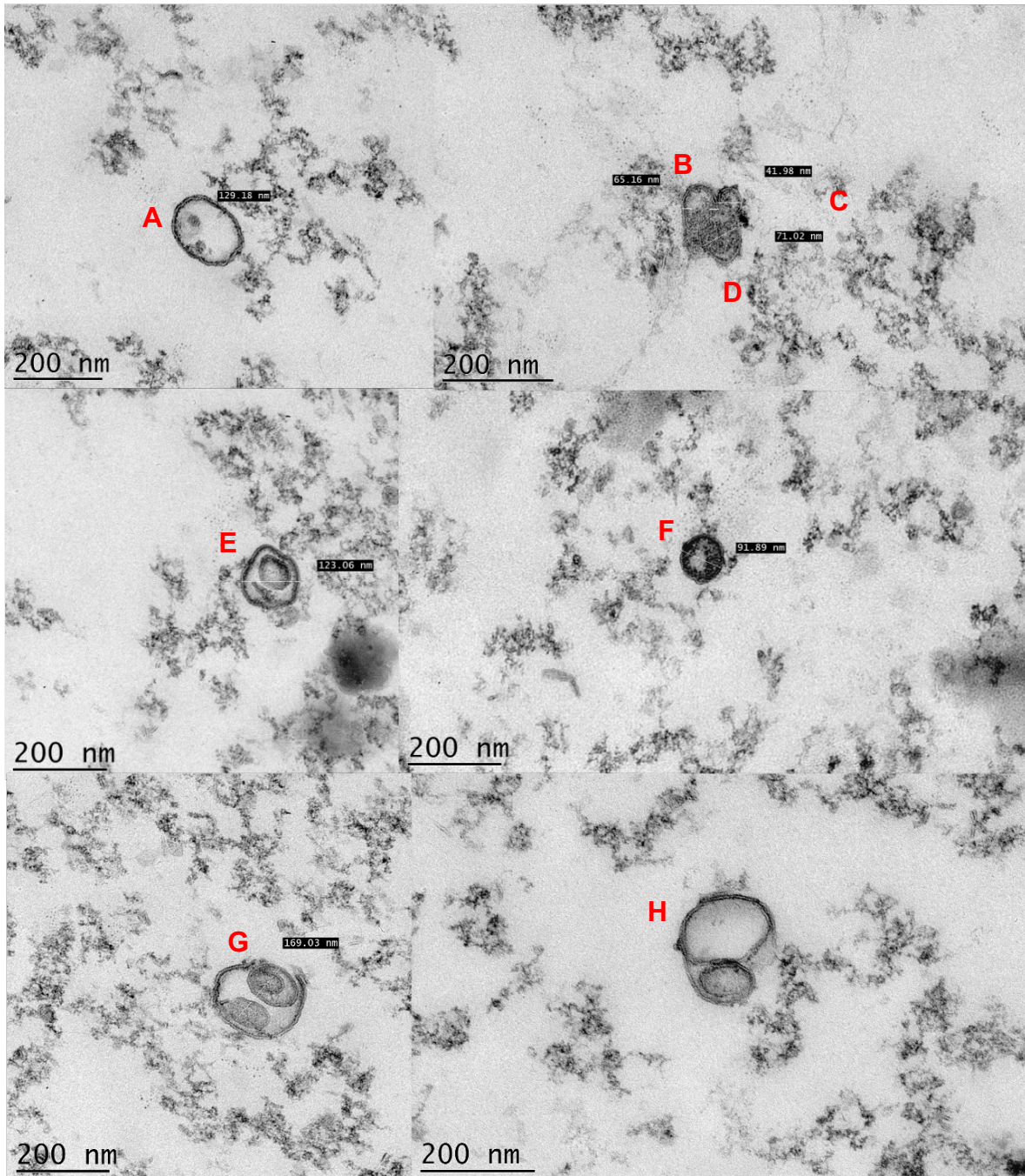


Figura 8. Micrografías por Microscopía Electronica de Transmisión (TEM) de las OMVs del aislado clínico KpBUAP021. Las OMVs fueron purificadas y diluidas en PBS. La barra de escala está a 200 nm.

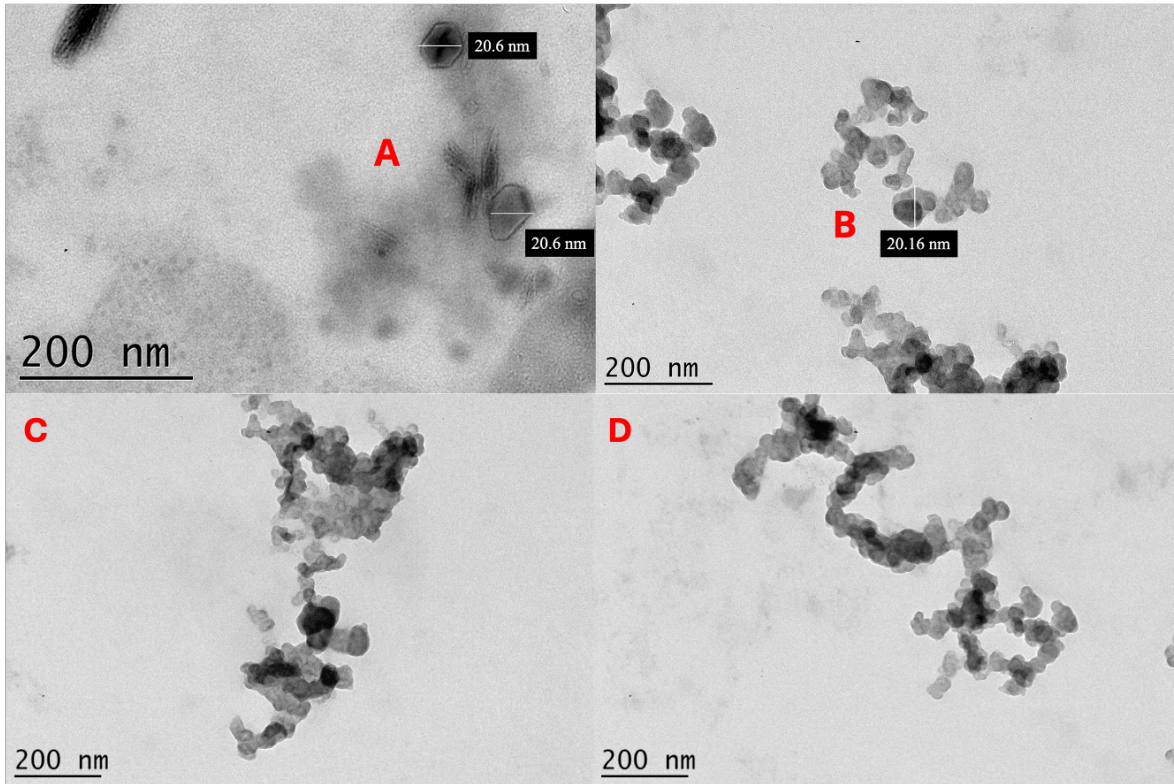


Figura 9. Micrografías por Microscopía Electronica de Transmisión (TEM) de las OMVs del aislado clínico KpBUAP003. Las OMVs fueron purificadas y diluidas en PBS. La barra de escala está a 200 nm

11.2 Respuesta inmune generada

El volumen promedio (109 μ l) de los sueros obtenidos en cada semana fue uniforme (Figura 11) lo cual permitió realizar los ensayos por semana y por triplicado, con el objetivo de analizar el aumento de la concentración de los anticuerpos.

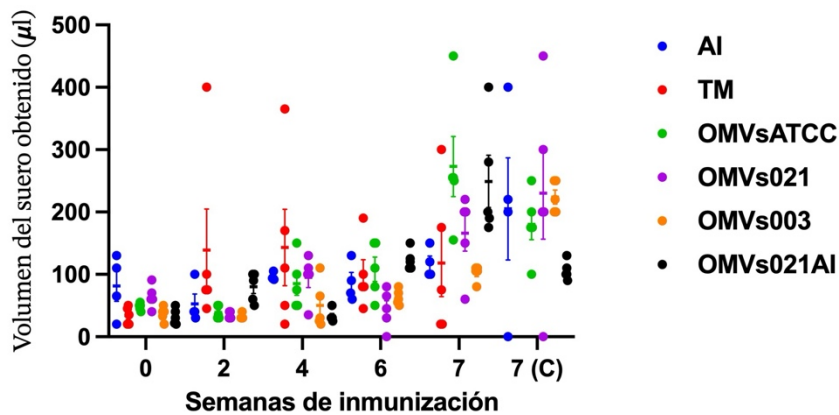


Figura 11. Promedio de los sueros obtenidos en cada semana de inmunización. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

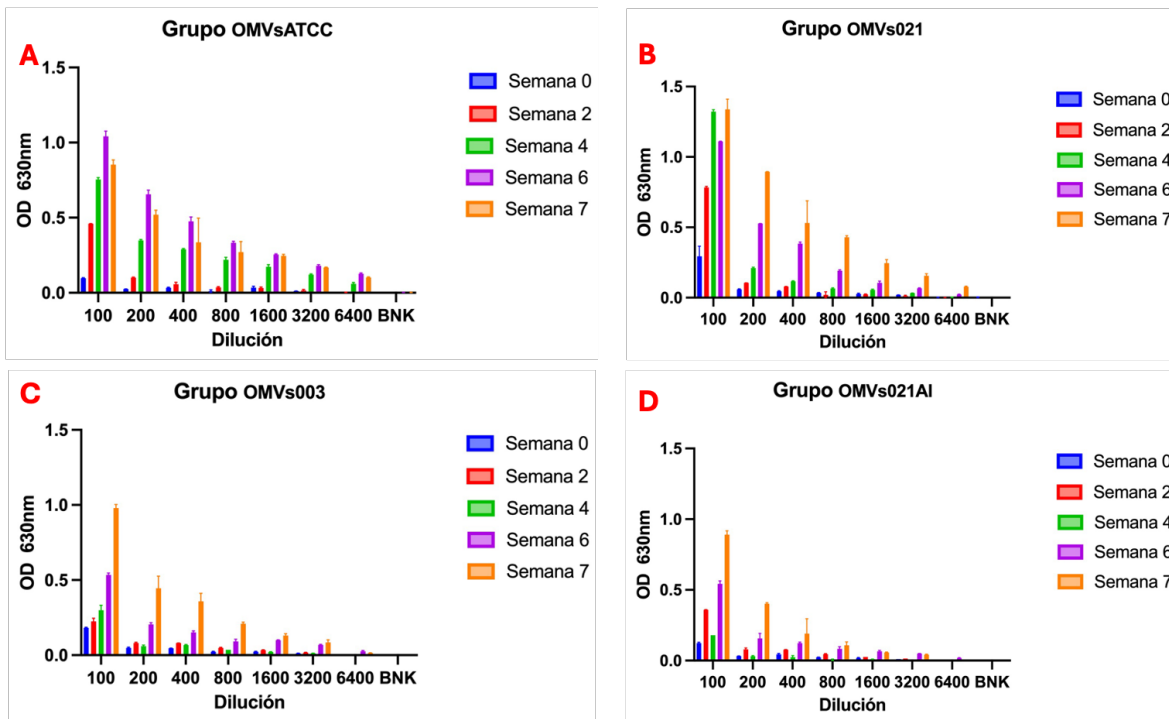


Figura 12. Gráficos de los títulos de anticuerpos generados en cada grupo murino a lo largo del esquema de inmunización. Las barras de error representan la desviación estandar de tres experimentos independientes.

Durante el esquema de inmunización se observó un aumento progresivo en la concentración de anticuerpos anti-OMVs de *K. pneumoniae* (Figura 12), lo que indica la activación de una respuesta inmune específica inducida por las microvesículas.

Igualmente se identificó que el título de anticuerpos anti-OMVs fue alto, alcanzando diluciones de hasta 1:3200 en la semana 7 para los grupos OMVsATCC, OMVs021 y OMVs 003 (Figura 12 A-C), a diferencia del grupo OMVs021AI (Figura 12 D), el cuál fue inmunizado únicamente con las OMVs sin el adyuvante TiterMax Gold, donde se generaron títulos de 1:1600, de tal manera las OMVs de KpBUAP021 son capaces de inducir la producción de anticuerpos incluso en usencia del adyuvante. La capacidad para inducir rápidamente una respuesta inmune se observó para el grupo inmunizado con OMVs021, alcanzando una dilución de 1:1600 (Figura 12 B) desde la semana 2; a diferencia del grupo OMVs003 el cual logró alcanzar títulos de anticuerpos de 1:400 en misma semana (Figura 12 C); lo que puede indicar que ciertos factores, como la composición de las OMVs, generaron una adecuada

estimulación de las células inmunitarias tras a la interacción con las OMVs, lo que influye en la producción de anticuerpos anti-OMVs. Para todos los experimentos posteriores del uso de los anti-OMVs, se seleccionaron los de la semana 7 debido a los altos títulos obtenidos.

Otro punto importante, es que nuestra cepa control, *K. pneumoniae* ATCC700603, comúnmente utilizada como control para la susceptibilidad antibiótica; demostró por primera vez la producción de OMVs, que a su vez se logró inducir la producción de anticuerpos anti-OMVs en el modelo murino BALB/c.

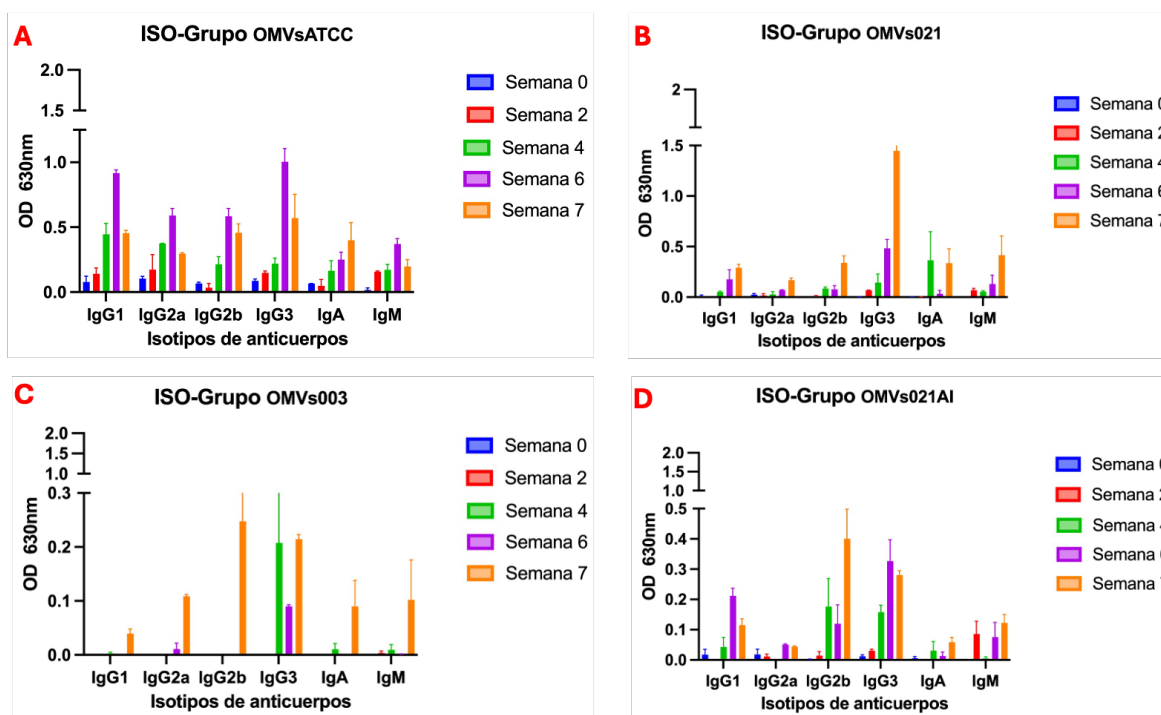


Figura 13. Gráficos de los isotipos de anticuerpos generados en cada grupo murino a lo largo del esquema de inmunización, utilizando el kit ISO2 de SIGMA. Las barras de error representan la desviación estandar de tres experimentos independientes.

Los isotipos de anticuerpos son dinámicos a lo largo de las semanas de inmunización en los cuatro grupos (Figura 13) y nuevamente se observa el aumento en la concentración de los anticuerpos dependiente de las inmunizaciones realizadas. Existe una diferencia en la inmunogenicidad de las OMVs de cada cepa, ya que los niveles de isotipos entre los grupos OMVsATCC, OMVs021 y OMVs021AI (Figura 13 A,B y D) son mayores con respecto al grupo OMVs003

(Figura 13 C); presuntamente indicando que este último grupo presenta OMVs menos inmunogénicas (grupo OMVs003); y para el grupo OMVs021 el factor que puede estar influyendo es la ausencia del adyuvante.

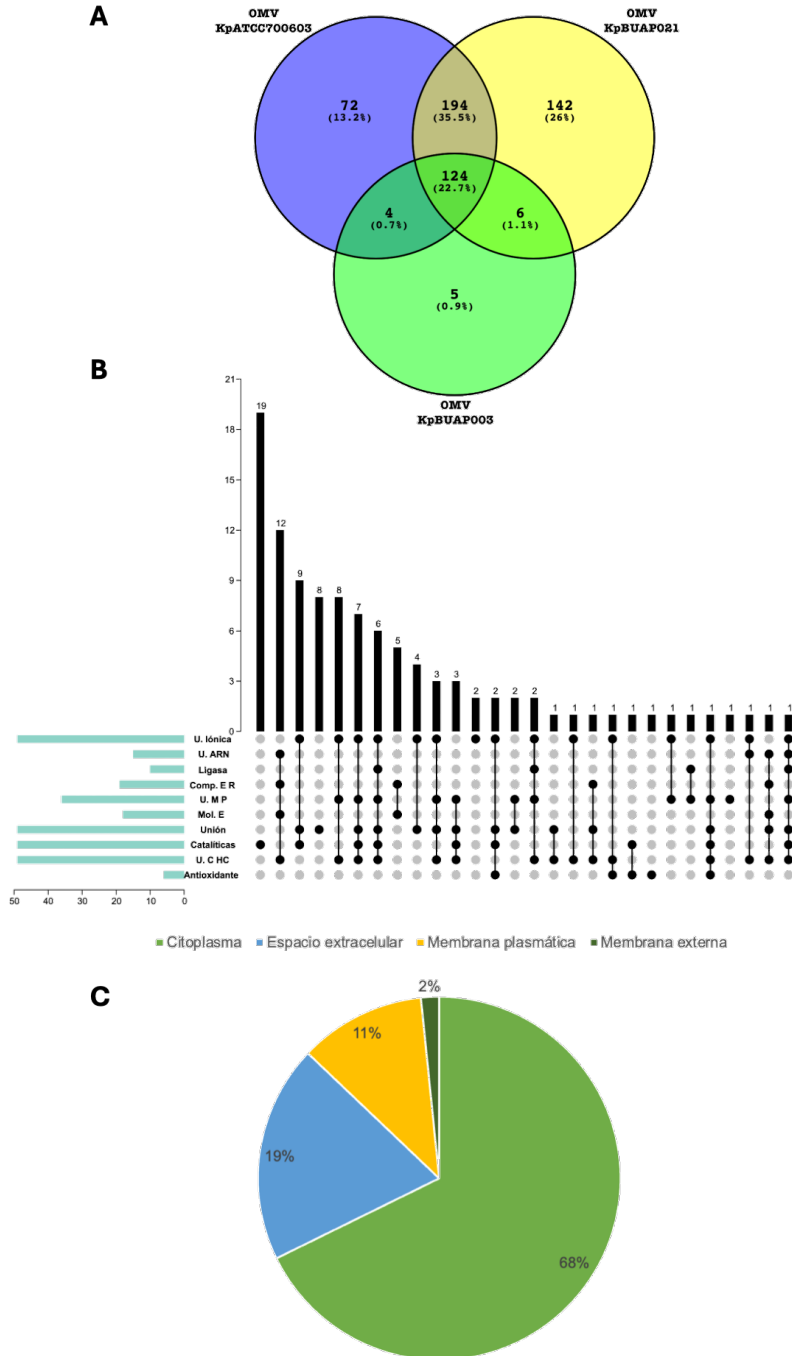
Existe una predominancia en la semana 7 del isotipo IgG3 en los grupos OMVsATCC y OMVs021, mientras que para los grupos OMVs003 y OMVs021AI el isotipo fue IgG2b. Sin embargo, algo que llama la atención es que específicamente para el grupo OMVs003, hasta la semana 4 se logra detectar un isotipo (IgG3) pero para la semana 7 cambia a IgG2b con una presencia de múltiples isotipos (Figura 13 C).

En el grupo OMVsATCC (Figura 13 A), se observó un aumento significativo en la producción de todos los isotipos de anticuerpos, alcanzando su pico máximo en la semana 6, posteriormente, en la semana 7, se registró una disminución en la concentración de los anticuerpos, lo que apunta a una regulación inmunitaria y/o a la eliminación del antígeno; mientras que para los grupos OMVs021, OMVs003 y OMVs021AI (Figura 13 B-D) se observó un aumento en la concentración de los isotipos a partir de la semana 7, a pesar de que la última inmunización se realizó en la semana 4.

11.3 Proteoma de las OMVs de *Klebsiella pneumoniae*

Al realizarse el análisis de las proteínas presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 se observó que las tres cepas comparten un total de 124 proteínas (Figura 14 A, Tabla 3) con diferentes funciones moleculares como actividades catalíticas, actividades de unión, actividades antioxidantes, de estructura y actividades de ligasa (Figura 14 B). Además, el 68% de estas proteínas provienen del citoplasma, seguido del espacio extracelular (19%), membrana plasmática (11%) y en menor porcentaje, 2% proteínas de membrana externa (Figura 14 C). Estas 124 proteínas están involucradas en rutas como biogénesis de ARN de transferencia, proteínas de movilidad, replicación de ADN, sistemas de secreción, entre otras; esto debido a que son enzimas, transportadores y proteínas de los ribosomas (Figura 15).

Figura 14. Análisis del proteoma de las OMVs de las tres cepas de *Klebsiella pneumoniae*.



A. En total las microvesículas de los aislados clínicos comparten 124 proteínas y en específico KpATCC700603 (72), KpBUAP021 (142) y KpBUAP003 (5).

B. Actividades de las 124 proteínas, destacando actividades de unión y catalíticas. Unión (U), Componentes estructurales del ribosoma (Comp. E R), Unión a moléculas pequeñas (U. M P), Moléculas estructurales (Mol. E), Unión de compuestos heterocíclicos (U. C HC).

C. Gráfico donde se representa el origen de las proteínas presentes en las OMVs.

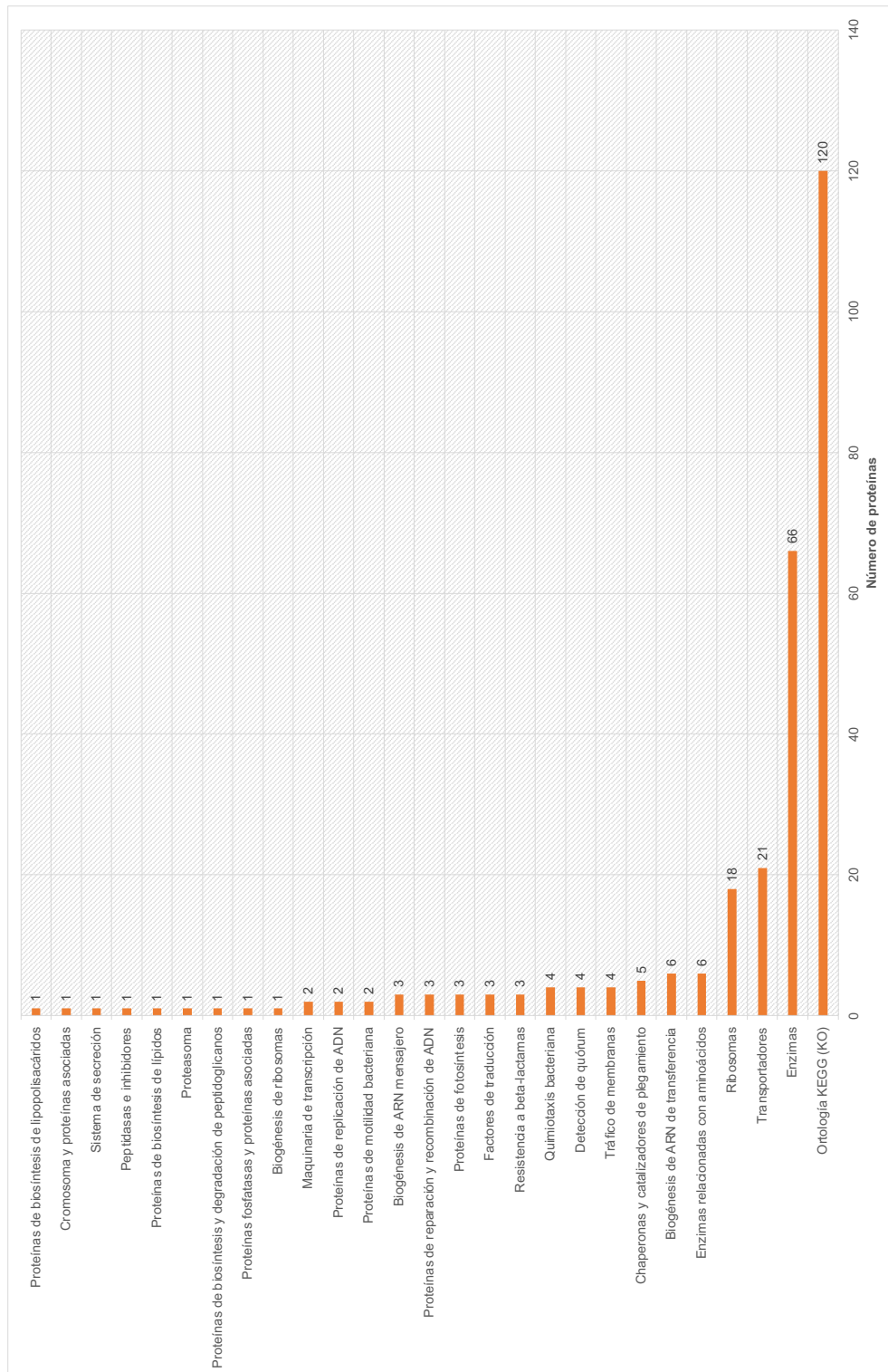


Figura 15. Rutas o mecanismos bacterianos, donde las proteínas presentes en las OMVs de las tres cepas están involucradas, el análisis se realizó en la base de datos KEGG (KO). Las barras representan el número de proteínas clasificadas en las rutas metabólicas.

Tabla 3. Identificación de proteínas presentes en común (124 proteínas) en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|--|---------------|-----------|
| 1 | A0A0H3GMV1 | 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferasa (Tetrahidropicolinato N-succiniltransferasa) (THDP succiniltransferasa) (THP succiniltransferasa) (Tetrahidropicolinato succinilasa) | 274 | 29832 |
| 2 | A0A0H3H2Q3 | Fosfoglicerato quinasa | 387 | 41133 |
| 3 | A0A0H3GWI0 | Transaldolasa | 318 | 35486 |
| 4 | A0A0H3GVC8 | Fructosa-bisfosfato aldolasa | 350 | 37906 |
| 5 | A0A0H3GZH5 | Proteína de unión al sustrato periplásmica del transportador de oligopéptidos ABC | 544 | 61389 |
| 6 | A0A0H3H0T6 | Proteína periplásmica de unión a D-galactosa/metil-galactósido MglB (Proteína periplásmica de unión a D-galactosa) (Proteína de unión a D-galactosa/D-glucosa) | 342 | 36916 |
| 7 | A0A0H3H1J3 | Inositol-1-monofosfatasa | 267 | 29320 |
| 8 | A0A0H3GV21 | Aminotransferasa | 396 | 43539 |
| 9 | A0A0H3GWM9 | Elongation factor G (EF-G) | 704 | 77543 |
| 10 | A0A0H3GVB4 | Subunidad beta de la ATP sintasa (subunidad beta del sector F1 de la ATP sintasa) (subunidad beta de la F-ATPasa) | 460 | 50210 |
| 11 | A0A0H3H0Y2 | Porina OmpK36 | 367 | 40079 |
| 12 | A0A0H3GZ22 | Proteína A (SspA) | 212 | 24190 |
| 13 | A0A0H3GWF8 | Cisteína sintetasa | 323 | 34558 |
| 14 | A0A0H3GWA1 | Malato deshidrogenasa | 312 | 32426 |
| 15 | A0A0H3GYY6 | Superóxido dismutasa | 193 | 21148 |
| 16 | A0A0H3GV85 | Fructosa-bisfosfato aldolasa (FBP aldolasa) | 359 | 39158 |
| 17 | A0A0H3GY04 | Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa (Polinucleótido fosforilasa) (PNPasa) | 711 | 76846 |
| 18 | A0A0H3H0J6 | Cadena gamma de la ATP sintasa (subunidad gamma del sector F1 de la ATP sintasa) (subunidad gamma de la F-ATPasa) | 287 | 31513 |
| 19 | A0A0H3GU72 | Proteína de unión periplásmica del transportador ABC | 381 | 42220 |
| 20 | A0A0H3H058 | Aspartato-ARNt ligasa (Aspartil-ARNt sintetasa) (AspRS) | 595 | 66415 |
| 21 | A0A0H3H458 | Proteína de unión periplásmica del transportador de glicerol-3-fosfato | 438 | 48213 |
| 22 | A0A0H3GW58 | Fosfoglucosamina mutasa | 445 | 47905 |
| 23 | A0A0H3GWE5 | Proteína de subunidad ribosómica grande bL19 | 115 | 13133 |
| 24 | A0A0H3GUZ7 | Formiato acetiltransferasa (Piruvato formiato liasa) | 760 | 85146 |
| 25 | A0A0H3H3W4 | Proteína de subunidad ribosómica grande uL16 | 136 | 15250 |
| 26 | A0A0H3GXB9 | Proteína modificadora de ARNt YgfZ | 327 | 35634 |
| 27 | A0A0H3GV88 | 6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilante | 468 | 51402 |
| 28 | A0A0H3GUG9 | Enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidro-liasa) (2-fosfoglicerato deshidratasa) | 432 | 45550 |
| 29 | A0A0H3GWI6 | Proteína subunidad ribosómica pequeña uS4 | 206 | 23502 |
| 30 | A0A0H3GZ37 | Subunidad alfa de la ATP sintasa (Subunidad alfa del sector F1 de la ATP sintasa) (Subunidad alfa de la F-ATPasa) | 513 | 55195 |
| 31 | A0A0H3H4X5 | Glutamina--fructosa-6-fosfato aminotransferasa [isomerizante] (D-fructosa-6-fosfato amidotransferasa) (GFAT) (Glucosamina-6-fosfato sintasa) (Hexosafosfato aminotransferasa) (L-glutamina--D-fructosa-6-fosfato amidotransferasa) | 609 | 66878 |

Continuación de la Tabla 3.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|--|---------------|-----------|
| 32 | A0A0H3GUU1 | Piruvato quinasa | 470 | 50688 |
| 33 | A0A0H3GU59 | Subunidad beta de la ligasa de succinato-CoA [formadora de ADP] (subunidad beta de la succinil-CoA sintetasa) (SCS-beta) | 388 | 41503 |
| 34 | A0A0H3GZX5 | Proteína de transporte de dipéptidos periplásmicos | 526 | 59212 |
| 35 | A0A0H3H3K2 | Proteína de tolerancia al tolueno Ttg2D | 211 | 23926 |
| 36 | A0A0H3GVL8 | Proteína periplásmica de unión a putrescina | 348 | 38873 |
| 37 | A0A0H3GY63 | Proteína de subunidad ribosomal pequeña uS9 | 130 | 14856 |
| 38 | A0A0H3GV06 | Subunidad transportadora de cistina | 266 | 28941 |
| 39 | A0A0H3GWS6 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP) (PCK) (PEP carboxiquinasa) (PEPCK) | 540 | 59577 |
| 40 | A0A0H3GV93 | Trehalasa periplásmica (Alfa,alfa-trehalasa) (Alfa,alfa-trehalosa glucosidrolasa) | 581 | 64309 |
| 41 | A0A0H3GY70 | Transcetolasa | 663 | 71863 |
| 42 | A0A0H3GZA8 | Proteína de subunidad ribosómica grande uL22 | 110 | 12196 |
| 43 | A0A0H3H3X4 | Proteína de subunidad ribosómica pequeña uS7 | 156 | 17618 |
| 44 | A0A0H3GVK0 | Proteína de subunidad ribosómica grande bL25 | 94 | 10638 |
| 45 | A0A0H3GXB7 | L-treonina 3-deshidrogenasa (TDH) | 341 | 37227 |
| 46 | A0A0H3GU79 | Fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (PGAM dependiente de BPG) (PGAM) (Fosfogliceromutasa) (dPGM) | 250 | 28318 |
| 47 | A0A0H3GU66 | Gamma-aminobutiraldehído deshidrogenasa | 172 | 18541 |
| 48 | A0A0H3GW02 | Transcetolasa | 664 | 72182 |
| 49 | A0A0H3GVV5 | Glicerol deshidrogenasa | 365 | 38990 |
| 50 | A0A0H3GYA6 | Proteína de subunidad ribosómica grande uL15 | 144 | 15135 |
| 51 | A0A0H3GU21 | Proteína de subunidad ribosómica pequeña uS3 | 232 | 25839 |
| 52 | A0A0H3GX74 | Proteína similar a fimbrial | 331 | 35063 |
| 53 | A0A0H3GUA1 | Alanina-ARNt ligasa (Alanil-ARNt sintetasa) (AlaRS) | 875 | 95636 |
| 54 | A0A0H3GWT3 | Lipoproteína NlpD | 378 | 39359 |
| 55 | A0A0H3GUH9 | AMP nucleosidasa (AMP nucleosidasa) | 455 | 51000 |
| 56 | A0A0H3GZJ7 | Glucosa-1-fosfato adenililtransferasa (ADP-glucosa pirofosforilasa) (ADPGlc PPasa) (ADP-glucosa sintasa) | 431 | 48521 |
| 57 | A0A0H3GWL1 | D-lactato deshidrogenasa | 329 | 36364 |
| 58 | A0A0H3GZ86 | Proteína de subunidad ribosómica grande bL17 | 128 | 14446 |
| 59 | A0A0H3GU26 | Proteína de subunidad ribosómica grande uL4 | 201 | 22114 |
| 60 | A0A0H3GXB1 | Transportador de casete de unión a ATP de la superfamilia ABC de hierro proteína de unión | 305 | 33575 |
| 61 | A0A0H3GUJ9 | Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP) (PCK) (PEP carboxiquinasa) (PEPCK) | 547 | 59285 |
| 62 | A0A0H3GXD3 | Subunidad grande de proteína ribosómica bL28 (proteína ribosómica 50S L28) | 66 | 7695 |

Continuación de la Tabla 3.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|--|---------------|-----------|
| 63 | A0A0H3GQX1 | NAD(P)H deshidrogenasa (quinona) (EC 1.6.5.2) (NAD(P)H:quinona oxidoreductasa) (NQO) | 198 | 20910 |
| 64 | A0A0H3GM71 | Co-chaperonina GroES (chaperonina de 10 kDa) (Chaperonina-10) (Cpn10) | 97 | 10374 |
| 65 | A0A0H3GIJ5 | Factor de elongación Ts (EF-Ts) | 283 | 30450 |
| 66 | A0A0H3GGS8 | Subunidad transportadora de D-ribosa RbsB | 296 | 31017 |
| 67 | A0A0H3GLE8 | Superóxido dismutasa | 206 | 22985 |
| 68 | A0A0H3GRD8 | Componente del sistema PTS específico de la glucosa | 169 | 18247 |
| 69 | A0A0H3GHX9 | Chaperonina GroEL (chaperonina de 60 kDa) (Chaperonina-60) (Cpn60) | 548 | 57126 |
| 70 | A0A0H3GTY9 | Alcohol deshidrogenasa | 336 | 35290 |
| 71 | A0A0H3GMB4 | Transaldolasa | 317 | 35266 |
| 72 | A0A0H3GH99 | Proteína de subunidad ribosómica grande bL12 | 121 | 12341 |
| 73 | A0A0H3GRR9 | Tiol peroxidasa (Tpx) (Peroxirredoxina tpx) (Prx) (Tiorredoxina peroxidasa) (Peroxirredoxina dependiente de tiorredoxina) | 168 | 17544 |
| 74 | A0A0H3GQZ9 | Proteína ribosómica 30S S1 | 557 | 61177 |
| 75 | A0A0H3GLI4 | Proteína de subunidad ribosómica grande bL9 | 149 | 15793 |
| 76 | A0A0H3GSX3 | Proteína chaperona HtpG (Proteína de choque térmico HtpG) (Proteína G de alta temperatura) | 624 | 71093 |
| 77 | A0A0H3GQ04 | Alquil hidropéroxido reductasa C (Peroxirredoxina) (Tiorredoxina peroxidasa) | 187 | 20763 |
| 78 | A0A0H3GKE1 | Proteína periplásmica transportadora ABC de glutamina | 248 | 27152 |
| 79 | A0A0H3GL73 | Glucosa-1-fosfatasa/inositol fosfatasa | 421 | 46180 |
| 80 | A0A0H3GQA5 | Citrato sintasa | 427 | 48002 |
| 81 | A0A0H3GN34 | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | 331 | 35471 |
| 82 | A0A0H3GJD9 | Dihidrolipoil deshidrogenasa | 474 | 50563 |
| 83 | A0A0H3GS79 | Permeasa del tripéptido mureína periplásmica (L-Ala-gamma-D-Glut-m-DAP) | 538 | 59660 |
| 84 | A0A0H3GIW3 | exotransglicosilasa lítica de peptidoglicano | 645 | 73160 |
| 85 | A0A0H3GTJ1 | Proteína de unión al autoinductor 2 LsrB | 333 | 35928 |
| 86 | A0A0H3GIQ6 | Fosfoheptosa isomerasa (Sedoheptulosa 7-fosfato isomerasa) | 193 | 20872 |
| 87 | A0A0H3GTI3 | Subunidad DhaK de la dihidroxiacetona quinasa | 356 | 38327 |
| 88 | A0A0H3GKX2 | Proteína de unión a maltodextrina | 396 | 43257 |
| 89 | A0A0H3GQ55 | Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (G6PD) | 491 | 55872 |
| 90 | A0A0H3GTV3 | Proteína chaperona ClpB | 823 | 91533 |
| 91 | A0A0H3GLP8 | Factor de elongación Tu (EF-Tu) | 394 | 43246 |
| 92 | A0A0H3GGN5 | Proteína subunidad ribosómica grande uL11 | 142 | 14875 |

Continuación de la Tabla 3.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|--|---------------|-----------|
| 93 | A0A0H3GMF6 | Componente de unión periplásmica del sistema de transporte de D-ribosa | 301 | 32291 |
| 94 | A0A0H3GTW5 | Biotina carboxilasa (subunidad A de la biotina carboxilasa de la acetil-coenzima A carboxilasa) | 449 | 49271 |
| 95 | A0A0H3GGT9 | Glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) (Fosfoglucosa isomerasa) (PGI) (Fosfohexosa isomerasa) (PHI) | 549 | 61328 |
| 96 | A0A0H3GMA6 | Fosfoserina aminotransferasa (Fosfohidroxitreonina aminotransferasa) (PSAT) | 362 | 39641 |
| 97 | A0A0H3GKG5 | Proteína de unión al sustrato periplásmica del transportador de péptidos ABC | 513 | 56460 |
| 98 | A0A0H3GRH0 | Isoleucina-ARNt ligasa (Isoleucil-ARNt sintetasa) (IleRS) | 950 | 105930 |
| 99 | A0A0H3GMF7 | Proteína A de membrana externa | 364 | 38977 |
| 100 | A0A0H3GMU4 | Nucleosidasa de 5'-metiltioadenosina/S-adenosilhomocisteína (nucleosidasa MTA/SAH) (MTAN) (nucleosidasa de 5'-desoxiadenosina) (nucleosidasa DOA) (nucleosidasa dAdo) (nucleosidasa de 5'-metiltioadenosina) (nucleosidasa MTA) (nucleosidasa S-adenosilhomocisteína) (nucleosidasa AdoHcy) (nucleosidasa SAH) (nucleosidasa SRH) | 232 | 24504 |
| 101 | A0A0H3GTE1 | Proteína de división celular FtsP | 470 | 51928 |
| 102 | A0A0H3GM18 | Aldehído deshidrogenasa | 456 | 49580 |
| 103 | A0A0H3GM89 | Purina nucleósido fosforilasa tipo DeoD (PNP) | 239 | 25945 |
| 104 | A0A0H3GNR6 | Glutarato 2-hidroxilasa (G-2-H) | 338 | 38810 |
| 105 | A0A0H3GRQ4 | Enoil-[proteína transportadora de acilo] reductasa [NADH] | 262 | 27911 |
| 106 | A0A0H3GLK1 | Tiorredoxina | 109 | 11851 |
| 107 | A0A0H3GK53 | Proteína TolB del sistema Tol-Pal | 430 | 45912 |
| 108 | A0A0H3GNB7 | Cadena beta de la triptófano sintasa | 397 | 42964 |
| 109 | A0A0H3GHD3 | Proteína de subunidad ribosomal pequeña bS18 | 75 | 8986 |
| 110 | A0A0H3GQ65 | Catalasa-peroxidasa (CP) (Peroxidasa/catalasa) | 725 | 78966 |
| 111 | A0A0H3GTT3 | Proteína de modulación Sigma(54) | 95 | 10759 |
| 112 | A0A0H3GGP0 | Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN (subunidad beta de la ARN polimerasa) (Subunidad beta' de la ARN polimerasa) (Subunidad beta' de la transcriptasa) | 1407 | 155262 |
| 113 | A0A0H3GSS7 | Proteína fimbrial MrkA | 202 | 20736 |
| 114 | A0A0H3H498 | Glutación-disulfuro reductasa | 450 | 48661 |
| 115 | A0A0H3GLR9 | Regulador transcripcional subunidad alfa HU | 90 | 9477 |
| 116 | A0A0H3GQQ0 | Asparagina--ARNt ligasa | 291 | 33317 |
| 117 | A0A0H3GI02 | Subunidad flavoproteica fumarato reductasa | 596 | 65517 |
| 118 | A0A0H3GU10 | Proteína subunidad ribosomal pequeña uS13 | 118 | 13211 |
| 119 | A0A0H3GRS5 | Serina hidroximetiltransferasa (SHMT) (Serina metilasa) | 417 | 45440 |
| 120 | A0A0H3GK43 | Subunidad alfa de la ligasa de succinato-CoA [formadora de ADP] (subunidad alfa de la succinil-CoA sintetasa) (SCS-alfa) | 289 | 29809 |
| 121 | A0A0H3GL04 | Proteína de unión al ADN monocatenario (SSB) | 174 | 18712 |
| 122 | A0A0H3GM66 | Aspartato amoniaco liasa (Aspartasa) | 478 | 52051 |
| 123 | A0A0H3GTI2 | Gamma-aminobutiraldehído deshidrogenasa | 313 | 33247 |
| 124 | A0A0H3GS09 | proteína de membrana externa W | 224 | 24336 |

11.4 Perfiles proteicos de los extractos bacterianos y extractos de las OMVs

Mediante el uso del gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se observa un bandeó constante entre los extractos proteicos

derivados de las OMVs de las tres cepas KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 (Figura 16.), específicamente bandas en las regiones de 15-20 (Figura 16 A, Tabla 4), 30-37 (Figura 16 B, Tabla 5), 40-50 (Figura 16 C, Tabla 6), 70-110 kDa (Figura 16 D, Tabla 7); sugiriendo una conservación de estas proteínas en las tres cepas, ya que son 56 proteínas con una predominancia en el bandeo. Nuevamente estas proteínas probablemente están involucradas en mecanismos clave por su conservación en las OMVs de *K. pneumoniae*, indicando una importancia funcional y estructural de las mismas.

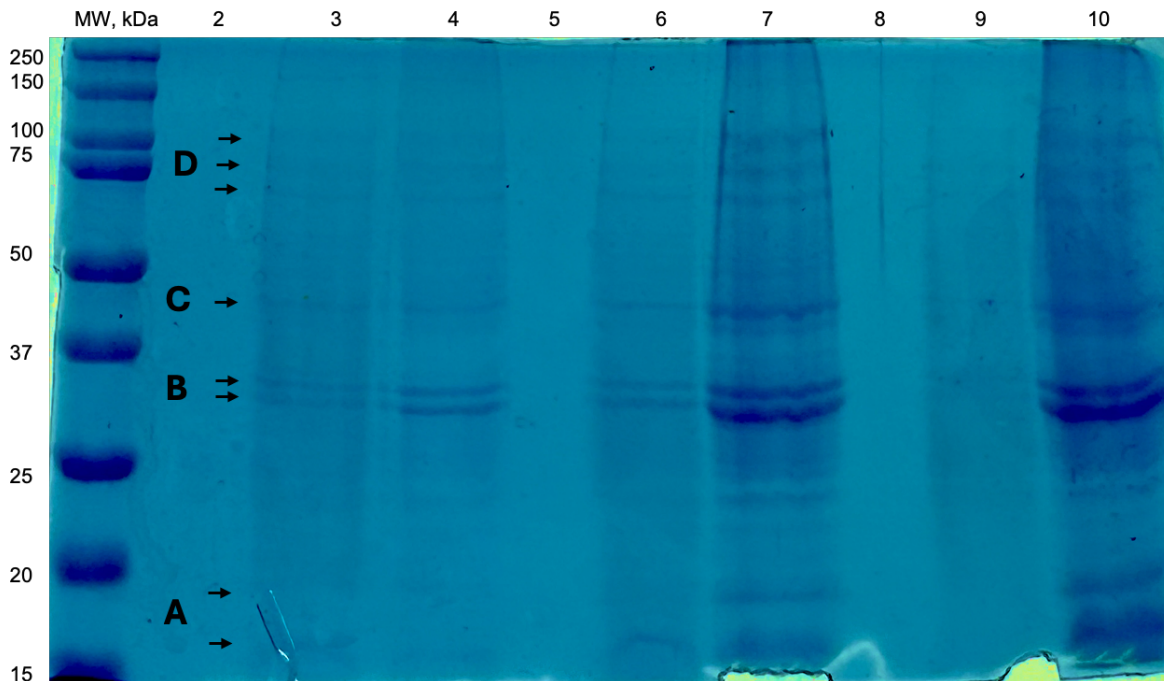


Figura 16. SDS-PAGE representativo de los extractos proteicos de *K. pneumoniae*. Se realizó la obtención de los extractos proteicos de los diferentes aislados clínicos, así como de sus respectivas OMVs, visualizándolos mediante SDS-PAGE al 10%. Carril 1. MW, Precision Plus Protein™ Standars (BIO-RAD); carril 3. OMVs KpATCC700603; carril 4. KpATCC700603; carril 6. OMVs KpBUAP021; carril 7. KpBUAP021; carril 9. OMVs KpBUAP003; carril 10. KpBUAP003. El ensayo se realizó en tres ocasiones de manera independiente.

Tabla 4. Proteínas con un peso molecular $\geq 15,000$ pero $\leq 20,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Masa (Da) |
|-----|------------|--|-----------|
| 1 | A0A0H3H3W4 | Proteína de subunidad ribosómica grande uL16 | 15250 |
| 2 | A0A0H3H3X4 | Proteína de subunidad ribosómica pequeña uS7 | 17618 |
| 3 | A0A0H3GU66 | Gamma-aminobutiraldehído deshidrogenasa | 18541 |
| 4 | A0A0H3GYA6 | Proteína de subunidad ribosómica grande uL15 | 15135 |
| 5 | A0A0H3GRD8 | Componente del sistema PTS específico de la glucosa | 18247 |
| 6 | A0A0H3GRR9 | Tiol peroxidasa (Tpx) (Peroxirredoxina tpx) (Prx) (Tiorredoxina peroxidasa) (Peroxirredoxina dependiente de tiorredoxina) | 17544 |
| 7 | A0A0H3GLI4 | Proteína de subunidad ribosómica grande bL9 | 15793 |
| 8 | A0A0H3GL04 | Proteína de unión al ADN monocatenario (SSB) | 18712 |

Tabla 5. Proteínas con un peso molecular $\geq 30,000$ pero $\leq 37,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Masa (Da) |
|-----|------------|--|-----------|
| 1 | A0A0H3GWI0 | Transaldolasa | 35486 |
| 2 | A0A0H3H0T6 | Proteína periplásmica de unión a D-galactosa/metil-galactósido MglB (Proteína periplásmica de unión a D-galactosa) (Proteína de unión a D-galactosa/D-glucosa) | 36916 |
| 3 | A0A0H3GWF8 | Cisteína sintetasa | 34558 |
| 4 | A0A0H3GWA1 | Malato deshidrogenasa | 32426 |
| 5 | A0A0H3H0J6 | Cadena gamma de la ATP sintasa (subunidad gamma del sector F1 de la ATP sintasa) (subunidad gamma de la F-ATPasa) | 31513 |
| 6 | A0A0H3GXB9 | Proteína modificadora de ARNt YgfZ | 35634 |
| 7 | A0A0H3GX74 | Proteína similar a fimbrial | 35063 |
| 8 | A0A0H3GWL1 | D-lactato deshidrogenasa | 36364 |
| 9 | A0A0H3GXB1 | Transportador de casete de unión a ATP de la superfamilia ABC de hierro, proteína de unión | 33575 |
| 10 | A0A0H3GIJ5 | Factor de elongación Ts (EF-Ts) | 30450 |
| 11 | A0A0H3GGS8 | Subunidad transportadora de D-ribosa RbsB | 31017 |
| 12 | A0A0H3GTY9 | Alcohol deshidrogenasa | 35290 |
| 13 | A0A0H3GMB4 | Transaldolasa | 35266 |
| 14 | A0A0H3GN34 | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | 35471 |
| 15 | A0A0H3GTJ1 | Proteína de unión al autoinductor 2 LsrB | 35928 |
| 16 | A0A0H3GMF6 | Componente de unión periplásmico del sistema de transporte de D-ribosa | 32291 |
| 17 | A0A0H3GQQ0 | Asparagina--ARNt ligasa | 33317 |
| 18 | A0A0H3GTI2 | Gamma-aminobutiraldehído deshidrogenasa | 33247 |

Tabla 6. Proteínas con un peso molecular $\geq 40,000$ pero $\leq 50,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Masa (Da) |
|-----|------------|---|-----------|
| 1 | A0A0H3H2Q3 | Fosfoglicerato quinasa | 41133 |
| 2 | A0A0H3GV21 | Aminotransferasa | 43539 |
| 3 | A0A0H3H0Y2 | Porina OmpK36 | 40079 |
| 4 | A0A0H3GU72 | Proteína de unión periplásmica del transportador ABC | 42220 |
| 5 | A0A0H3H458 | Proteína de unión periplásmica del transportador de glicerol-3-fosfato | 48213 |
| 6 | A0A0H3GW58 | Fosfoglucosamina mutasa | 47905 |
| 7 | A0A0H3GUG9 | Enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidro-liasa) (2-fosfoglicerato deshidratasa) | 45550 |
| 8 | A0A0H3GU59 | Subunidad beta de la ligasa de succinato-CoA [formadora de ADP] (subunidad beta de la succinil-CoA sintetasa) (SCS-beta) | 41503 |
| 9 | A0A0H3GZJ7 | Glucosa-1-fosfato adenililtransferasa (ADP-glucosa pirofosforilasa) (ADPGlc PPasa) (ADP-glucosa sintasa) | 48521 |
| 10 | A0A0H3GL73 | Glucosa-1-fosfatasa/inositol fosfatasa | 46180 |
| 11 | A0A0H3GQA5 | Citrato sintasa | 48002 |
| 12 | A0A0H3GKX2 | Proteína de unión a maltodextrina | 43257 |
| 13 | A0A0H3GLP8 | Factor de elongación Tu (EF-Tu) | 43246 |
| 14 | A0A0H3GTW5 | Biotina carboxilasa (subunidad A de la biotina carboxilasa de la acetil-coenzima A carboxilasa) | 49271 |
| 15 | A0A0H3GM18 | Aldehído deshidrogenasa | 49580 |
| 16 | A0A0H3GK53 | Proteína TolB del sistema Tol-Pal | 45912 |
| 17 | A0A0H3GNB7 | Cadena beta de la triptófano sintasa | 42964 |
| 18 | A0A0H3H498 | Glutación disulfuro reductasa | 48661 |
| 19 | A0A0H3GRS5 | Serina hidroximetiltransferasa (SHMT) (Serina metilasa) | 45440 |

Tabla 7. Proteínas con un peso molecular $\geq 70,000$ pero $\leq 110,000$ Da presentes en las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Masa (Da) |
|-----|------------|--|-----------|
| 1 | A0A0H3GWM9 | Factor de elongación G (EF-G) | 77543 |
| 2 | A0A0H3GY04 | Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa (Polinucleótido fosforilasa) (PNPasa) | 76846 |
| 3 | A0A0H3GUZ7 | Formiato acetiltransferasa (Piruvato formiato-liasa) | 85146 |
| 4 | A0A0H3GY70 | Transcetolasa | 71863 |
| 5 | A0A0H3GW02 | Transcetolasa | 72182 |
| 6 | A0A0H3GUA1 | Alanina-ARNt ligasa (Alanil-ARNt sintetasa) (AlaRS) | 95636 |
| 7 | A0A0H3GSX3 | Proteína chaperona HtpG (Proteína de choque térmico HtpG) (Proteína G de alta temperatura) | 71093 |
| 8 | A0A0H3GIW3 | exotransglicosilasa lítica de peptidoglicano | 73160 |
| 9 | A0A0H3GTV3 | Proteína chaperona ClpB | 91533 |
| 10 | A0A0H3GRH0 | Isoleucina--ARNt ligasa (Isoleucil-ARNt sintetasa) (IleRS) | 105930 |
| 11 | A0A0H3GQ65 | Catalasa-peroxidasa (CP) (Peroxidasa/catalasa) | 78966 |

11.5 Identificación de Proteínas potencialmente inmunogénicas en *Klebsiella pneumoniae*

Se realizaron ensayos de Western blot para evaluar la especificidad y la reactividad de los anticuerpos anti-OMVsATCC, anti-OMVs021 y anti-OMVs003 frente a los extractos bacterianos de las tres cepas utilizadas de *K. pneumoniae* y los extractos proteicos de sus OMVs. Se realizaron transferencias a membranas de nitrocelulosa que posteriormente interaccionaron con los tres anticuerpos de forma homóloga independiente y por triplicado, lo que reveló la presencia de dos bandas principales en cada blot, aproximadamente de 50 kDa y entre 30-37 kDa para los anticuerpos anti-OMVsATCC (Figura 17 A,B) y de aproximadamente 75 kDa y ente 30-37 kDa para los anti-OMVs021 (Figura 17 C,D); sin embargo para los anticuerpos anti-OMVs003 no se identificó un bandeo (resultados no mostrados).

Por lo tanto, la banda en común en las OMVs (~30-37 kDa) y los extractos bacterianos de todas las cepas (KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003) sugiere que esta proteína es un componente conservado y relevante en las microvesículas de *K. pneumoniae* y se sugiere su investigación con el fin de determinar su posible uso. Ahora, la banda (~50 kDa) que se detectó exclusivamente en el extracto bacteriano de KpATCC700603 y por los anti-OMVsATCC, indica una especificidad alta hacia un antígeno exclusivo de esta cepa; lo mismo sucede con la única banda detectada (~75 kDa) en el extracto bacteriano de KpBUAP021 y con sus anti-OMVs021.

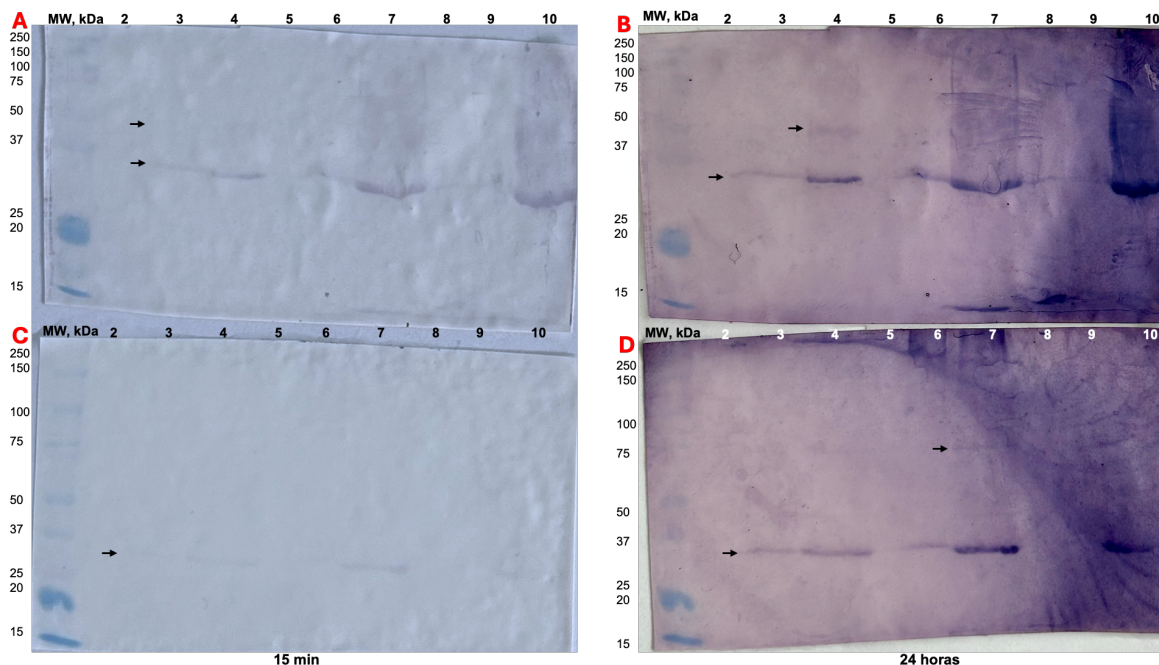


Figura 17. Western Blot representativo de los extractos proteicos de *K. pneumoniae* utilizando los anticuerpos anti-OMVs. Se realizó la transferencia de los extractos proteicos de los diferentes aislados clínicos, así como de sus respectivas OMVs en membranas de nitrocelulosa para realizar el inmuno ensayo con los anticuerpos anti-OMVsATCC (A-B) y anti-OMVs021 (CD). Carril 1. MW, Precision Plus Protein™ Standars (BIO-RAD); carril 3. OMVs KpATCC700603; carril 4. KpATCC700603; carril 6. OMVs KpBUAP021; carril 7. KpBUAP021; carril 9. OMVs KpBUAP003; carril 10. KpBUAP003. El ensayo se realizó en tres ocasiones de manera independiente.

La evaluación de las proteínas candidatas que posiblemente corresponden a las tres diferentes bandas observadas en el Western blot se realizó utilizando la herramienta bioinformática VaxiJen v3.0. Esta herramienta predice la inmunogenicidad basándose en propiedades fisicoquímicas de las proteínas.

Para la posible banda observada de ~30-37 kDa se analizaron las secuencias de las 18 posibles proteínas reportadas en la Tabla 5, para la banda de ~50 kDa se analizaron únicamente cinco proteínas cercanas al peso molecular reportadas en la Tabla 6 y se tomaron las proteínas propias de cada cepa (Anexos 5-7), en este caso, de las 72 proteínas de la cepa KpATCC700603 se seleccionaron siete proteínas cercanas a 50 kDa (**A0A0H3GWQ1**, **A0A0H3GV01**, **A0A0H3GTF8**,

A0A0H3GVB1, A0A0H3GSQ9, A0A0H3GXZ5 y A0A0H3GSS3) y para la cepa KpBUAP021, se seleccionó una sola proteína cercana a 75 kDa (**A0A0H3GKA3**). Así que de las 39 proteínas analizadas (Figura 18) en el software VaxiJen v3.0 el 7.7% tiene un posible potencial inmunogénico del 100%, específicamente la proteína similar fimbrial (**A0A0H3GX74**) para la banda de ~30-37 kDa y para la banda de ~75 kDa, son Catalasa-peroxidasa (CP) (**A0A0H3GQ65**) y Transportador de vitamina B12 BtuB (**A0A0H3GKA3**). Por otro lado, el 5.1% presentaron un potencial inmunogénico moderado, con una probabilidad del 66% por lo que la banda de ~50 kDa puede corresponder a la proteína Glutación disulfuro reductasa (**A0A0H3H498**) y la otra proteína que posiblemente se muestra en la banda de ~30-37 kDa es la Subunidad transportadora de D-ribosa RbsB (**A0A0H3GGS8**). Los resultados completos se pueden consultar en el anexo 8.

Estos hallazgos sugieren que la mayoría de las proteínas observadas en el gel de poliacrilamida no son inmunogénicas y aquellas identificadas como probablemente inmunogénicas podrían desempeñar papeles cruciales en la respuesta inmune.

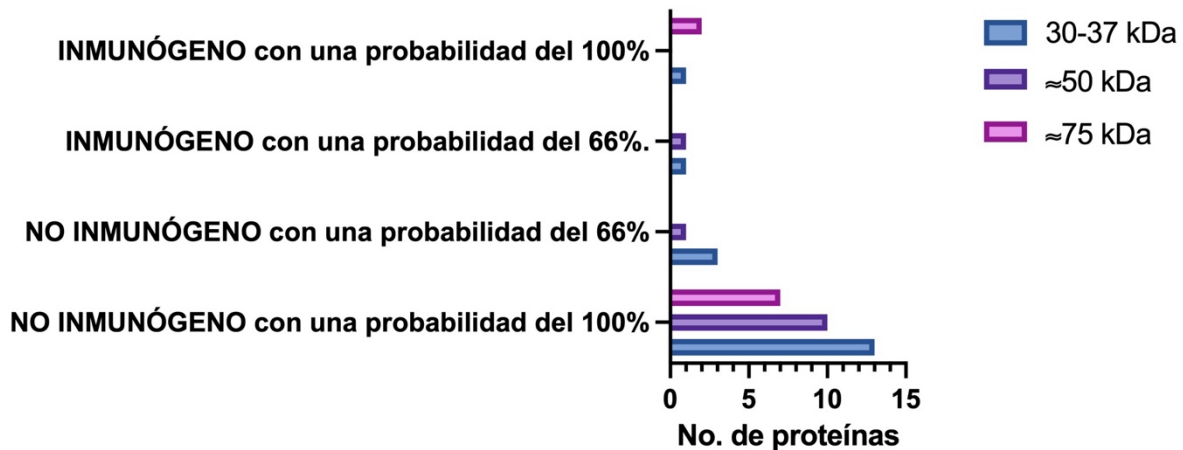


Figura 18. Evaluación de la inmunogenicidad de las posibles proteínas observadas en el bandeo del Western Blot con los anticuerpos anti-OMVsATCC y anti-OMVs021. Distribución del potencial inmunogénico de 39 proteínas de *K. pneumoniae*, evaluadas mediante VaxiJen v3.0. Las barras representan el número de proteínas clasificadas como inmunógenas.

11.6 Especificidad de los anticuerpos anti-OMVs mediante inmunofluorescencia

Para el análisis de la inmunofluorescencia se utilizaron como primer anticuerpo, los anti-OMVs con sus respectivas cepas de origen, por ejemplo para las OMVsATCC y su bacteria (KpATCC700603) se utilizó anti-OMVsATCC y así respectivamente. Para la cuantificación precisa de la señal de fluorescencia se utilizó el software CellProfiler. Para cada cepa, se seleccionó una imagen representativa (Figuras 19, 20 y 21), mientras que las otras imágenes se incluyen en los anexos 9-11 para referencia detallada. Los anticuerpos anti-OMVsATCC muestran una interacción clara con las OMVs purificadas a partir de la misma cepa (Figura 19); los anticuerpos anti-OMVs021 reconocieron a las OMVs purificadas (Figura 20) y los anticuerpos anti-OMVs003 también fueron capaces de interactuar con sus OMVs derivadas de su cepa de origen (Figura 21).

Para el caso de reconocimiento por parte de los anticuerpos-anti-OMVs, se mezclaron bacterias en las preparaciones, la inmunofluorescencia reveló patrones de interacción en las bacterias; por ejemplo, en las cepas KpATCC700603 y KpBUAP003 existe una localización polar de los antígenos detectados por los anti-OMVsATCC y anti-OMVs003; para la cepa KpBUAP021 la localización se ve alrededor de la bacteria. Estos resultados proporcionan información sobre la interacción generada entre los diversos antígenos presentes en las OMVs y sus anticuerpos generados por la inmunización, lo que refleja la inmunogenicidad de las OMVs al inducir una respuesta inmune humoral.

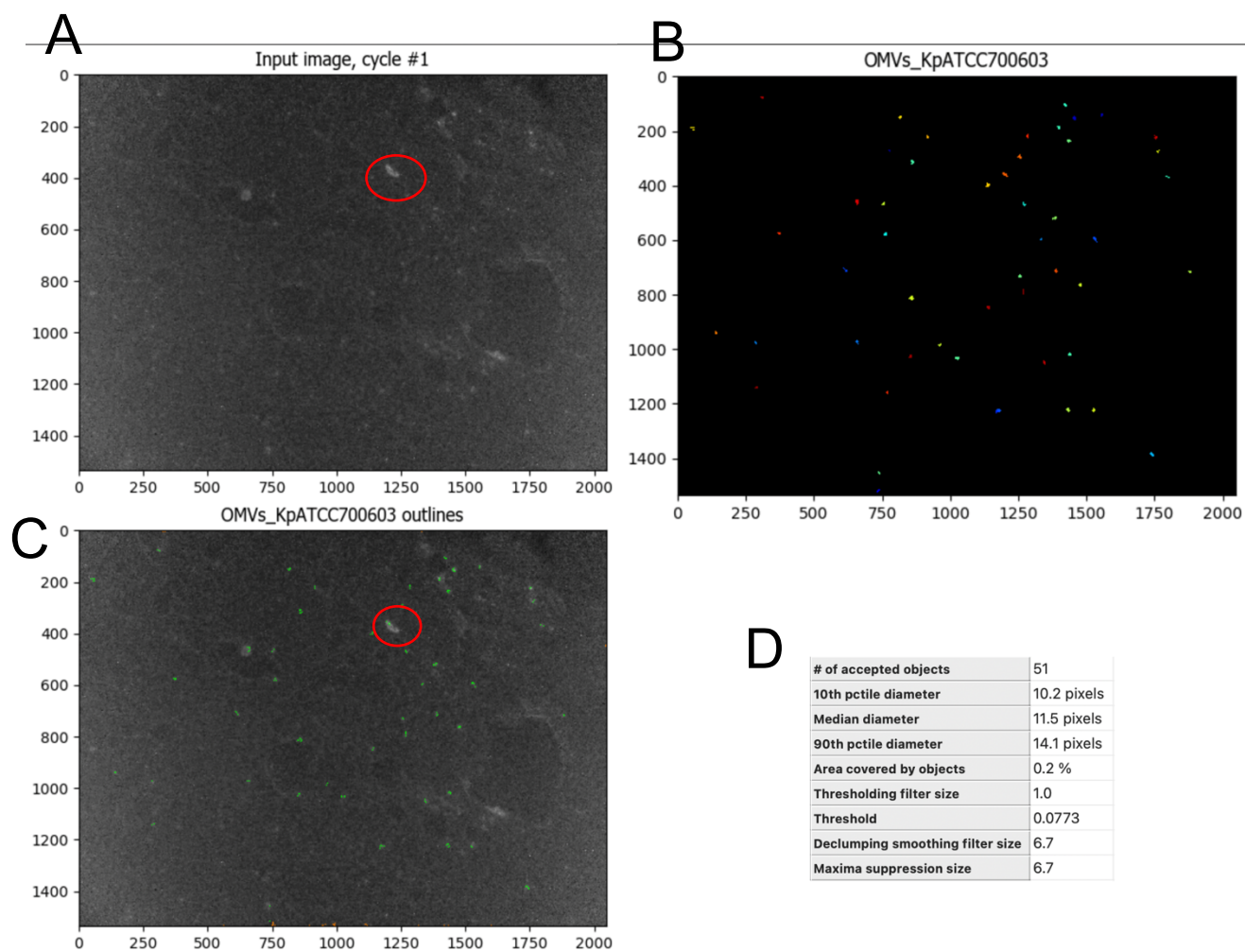


Figura 19. Análisis de inmunofluorescencia de las OMVsATCC y KpATCC700603 utilizando anticuerpos primarios anti-OMVsATCC y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. A. Imagen obtenida directamente del microscopio con objetivo de 100x. B. señales fluorescentes post-análisis que corresponden a la localización de los conglomerados de OMVs. C. Contornos verdes resaltan la ubicación precisa de las señales detectadas. D. Detalles del análisis de imagen. La presencia de bacilos se muestra en círculos rojos y los conglomerados de OMVs son los puntos más pequeños observados.

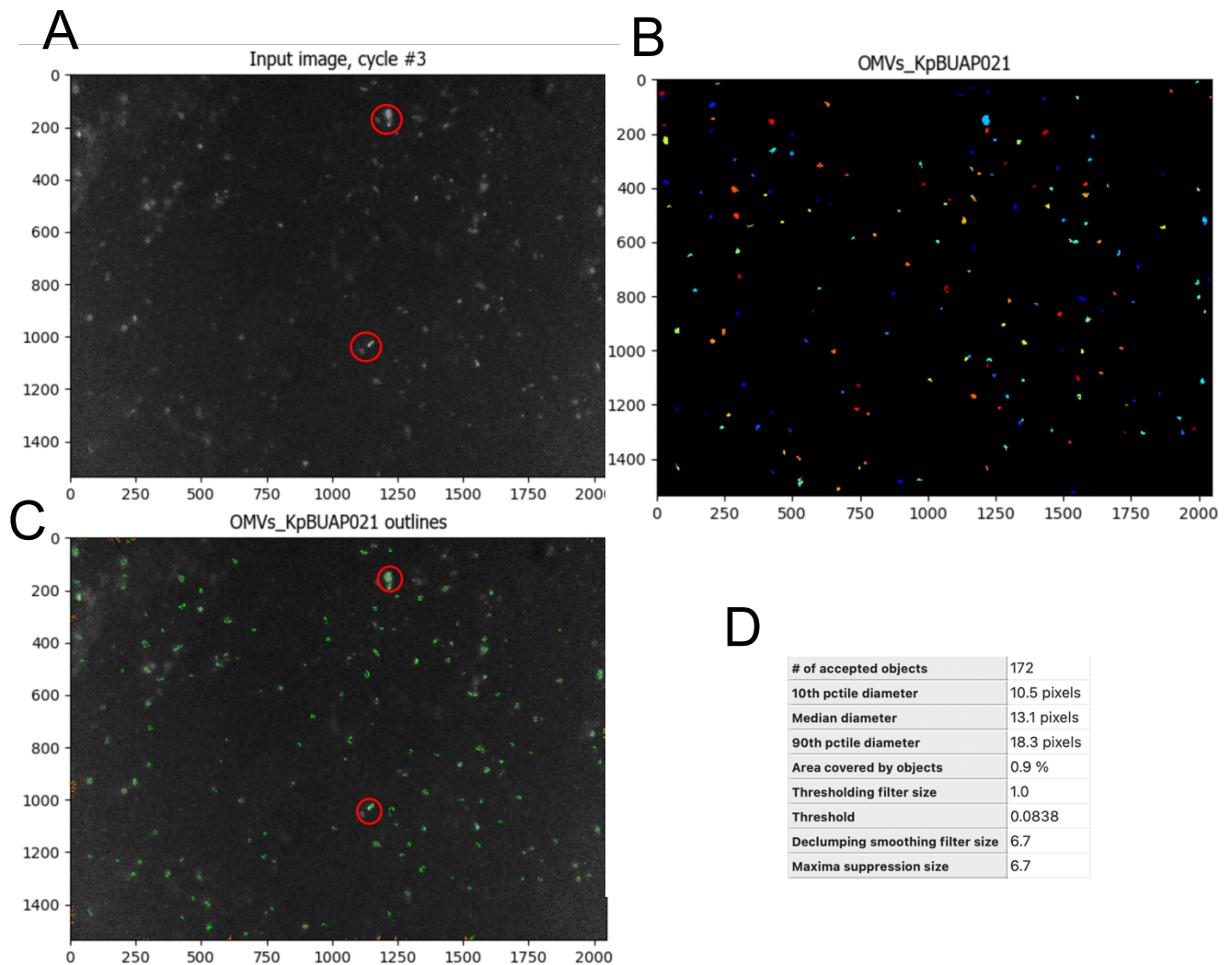


Figura 20. Análisis de inmunofluorescencia de las OMVs021 y KpBUAP021 utilizando anticuerpos primarios anti-OMVs021 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC.. **A.** Imagen obtenida directamente del microscopio con objetivo de 100x. **B.** señales fluorescentes post-análisis que corresponden a la localización de los conglomerados de OMVs. **C.** Contornos verdes resaltan la ubicación precisa de las señales detectadas. **D.** Detalles del análisis de imagen. La presencia de bacilos se muestra en círculos rojos y los conglomerados de OMVs son los puntos más pequeños observados.

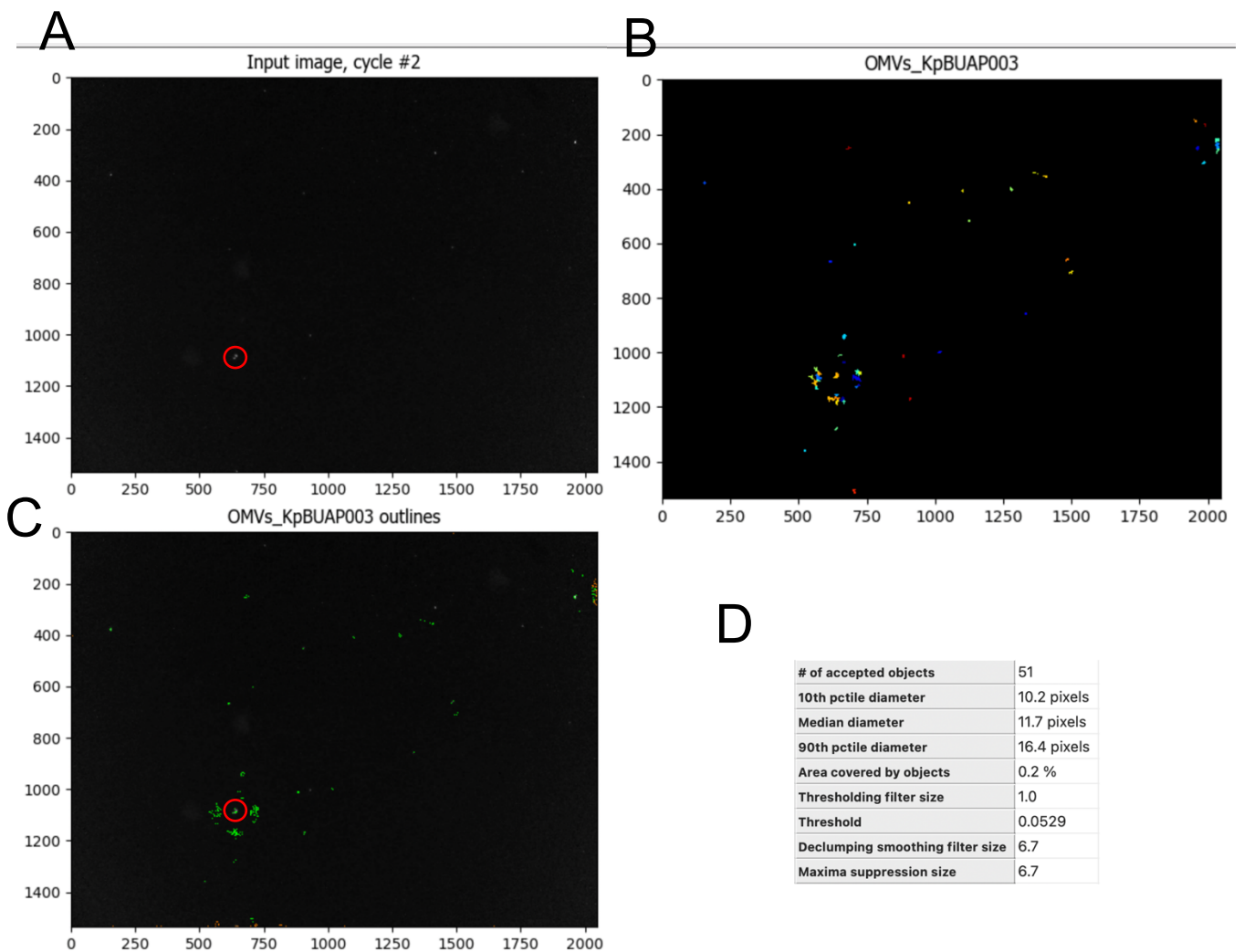


Figura 21. Análisis de inmunofluorescencia de las OMVs003 y KpBUAP003 utilizando anticuerpos primarios anti-OMVs003 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. A. Imagen obtenida directamente del microscopio con objetivo de 100x. B. señales fluorescentes post-análisis que corresponden a la localización de los conglomerados de OMVs. C. Contornos verdes resaltan la ubicación precisa de las señales detectadas. D. Detalles del análisis de imagen. La presencia de bacilos se muestra en círculos rojos y los conglomerados de OMVs son los puntos más pequeños observados.

11.7 Cambios en la susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* a antibióticos posterior a la interacción con los anticuerpos anti-OMVs

Se realizaron antibiogramas mediante Kirby Bauer para evaluar la sensibilidad a antibióticos de las cepas KpATCC700603, KpBUAP021, KpBUAP003 y como

control se utilizó a *Citrobacter freundii* (Resistente: NF, CL, STX, CFX, CF, CB; Resistencia intermedia: CPF; Sensible: AK, GE, NET, NOF)

Se midieron los diámetros de los halos de inhibición posterior a las 16 hrs de incubación y se determinó la susceptibilidad de cada cepa según las normas del CLSI 2024. Los resultados mostraron variaciones en la sensibilidad de las cepas frente a los diferentes antibióticos posterior a la interacción con los anti-OMVs utilizados (Figuras 22-25).

Los resultados para KpATCC700603 muestran variaciones en la susceptibilidad, como se observa en la Figura 22, la resistencia a los antibióticos cambió dependiendo del tipo de anticuerpos utilizado para la interacción. Por ejemplo, el tratamiento con anti-OMVsATCC (Figura 22 A) generó un cambio en el antibiótico de Ofloxacina (OF), indicando una sensibilidad a comparación con el control negativo (Figura 22 D) que tiene una sensibilidad intermedia. En contraste con el tratamiento de anti-OMVs003 (Figura 22 C) que generó una resistencia al antibiótico. Este mismo fenómeno paso con el antibiótico Norfloxacin (NOR), que posterior al tratamiento con anti-OMVsATCC, la cepa se volvió resistente y tenía una sensibilidad intermedia. Por último, los tres anticuerpos (Figura 22 A-C) ocasionaron un aumento en la resistencia a Amikacina (AK). Por lo tanto, existe una alteración de la respuesta a los antibióticos generada por la interacción con los anti-OMVs y KpATCC700603.

Para el caso de la cepa KpBUAP021 solo se observó un cambio en la susceptibilidad a Ciprofloxacino (CI), ya que los tres anticuerpos (Figura 23 A-C) generaron una resistencia a este antibiótico, comparado con el control negativo (Figura 23 D) que presentaba una sensibilidad intermedia.

Nuevamente posterior a la interacción con los anti-OMVsATCC (Figura 24 A), la cepa KpBUAP003 cambio de ser sensible en el control negativo (Figura 24 D) a una resistencia al antibiótico de Ceftazidima (CAZ); mientras que los tres anticuerpos (Figura A-C) ocasionaron que la cepa mostrara una sensibilidad intermedia frente a Cefdinir (CD).

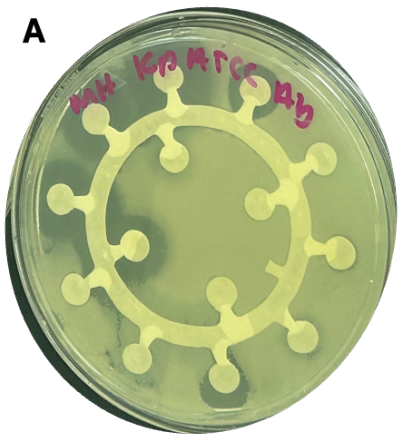
La interacción de los anticuerpos (Figura 25 A-C) y *C. freundii* generó cambios sin importar el tipo de anti-OMVs, es decir fueron más uniformes en cuanto al cambio de susceptibilidad, sin embargo, sí depende del antibiótico con el que este la cepa y los anti-OMVs. Es decir, la cepa tenía una resistencia frente el antibiótico de Ofloxacino (OF) (Figura 25 D), fue disminuida gracias a los anticuerpos anti-OMVs, ocasionando una sensibilidad frente a esta quinolona. En contraste, la sensibilidad presente en el control negativo frente a Gentamicina (GM), disminuyó con la presencia de los anti-OMVs, ya que ahora *C. freundii* presentaba una resistencia intermedia frente a este aminoglucósido en específico.

Los resultados anteriores indican que los anticuerpos anti-OMVsATCC son capaces de generar cambios en la susceptibilidad bacteriana, sin importar el tipo de antibiótico, ya que causó cambios en quinolonas (OF, CI, NOR), aminoglucósidos (AK, GM) y cefalosporinas (CD, CAZ); los anti-OMVs021 y anti-OMVs003 lo hacen en un menor número de antibióticos, pero de los mismos grupos: quinolonas (OF, CI), aminoglucósidos (AK, GM) y cefalosporina (CD). Si comparamos el cambio en la sensibilidad a los antibióticos antes mencionados y que comparten cambios en las cuatro cepas (OF, GM, CD, CI, AK), la presencia de los anticuerpos anti-OMVs y los aminoglucósidos (AK, GM) producen una disminución en la sensibilidad bacteriana en por lo menos una cepa; de ser sensibles pasan a tener una resistencia intermedia, mientras que en la cefalosporina (CD) aumentan la sensibilidad, de ser resistentes, ahora presentan una resistencia intermedia. Finalmente, para las quinolonas (OF, CI) la sensibilidad aumenta en el caso de Ofloxacino, pero disminuye en Ciprofloxacino (CI).

KPATCC700603

| Antibiótico | anti-OMVsATCC | anti-OMVs021 | anti-OMVs003 | NC |
|-------------|---------------|--------------|--------------|----|
| CAZ | R | R | R | R |
| ★ OF | S | I | R | I |
| CD | R | R | R | R |
| FIX | R | R | R | R |
| NA | R | R | R | R |
| CRO | R | R | R | R |
| CTX | R | R | R | R |
| AT | R | R | R | R |
| ★ NOR | R | I | I | I |
| CI | R | R | R | R |
| ★ AK | I | I | I | S |
| GM | R | R | R | R |
| XM | R | R | R | R |
| NI | R | R | R | R |

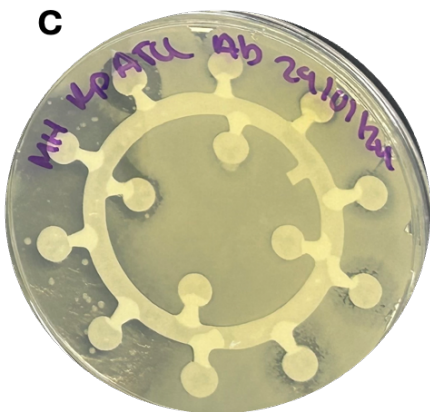
Figura 22. Perfil de sensibilidad de KpATCC700603 a antibióticos, tratada con anticuerpos anti-OMVs. Placa representativa de sensibilidad a antibióticos después de la incubación con anticuerpos A. anti-OMVsATCC. B. anti-OMVs021. C. anti-OMVs003. D. Control negativo (NC) sin tratamiento de anticuerpos. La tabla muestra la susceptibilidad o resistencia de la cepa a diversos antibióticos indicados en las filas, y los resultados están marcados por colores que representan resistencia [rojo, (R)], sensibilidad [verde, (S)] e intermedia [amarillo, (I)] de acuerdo con el CLSI 2024. En asterisco azul están resaltados aquellos antibióticos que cambiaron posterior a la interacción con los anticuerpos. Antibióticos utilizados: Ceftazidima-30 µg (CAZ), Ofloxacina-5 µg (OF), Cefdinir-5 µg (CD), Cefixima-5 µg (FIX), Ácido Nalidixico-30 µg (NA), Ceftriaxona-30 µg (CRO), Cefotaxima-30 µg (CTX), Aztreonam-30 µg (AT), Norfloxacin-10µg (NOR), Ciprofloxacina-5 µg (CI), Amikacina-30µg (AK), Gentamicina-10 µg (GM), Cefuroxima-30 µg (XM) y Nitrofurantoina-300 µg (NI). El ensayo se realizó en tres ocasiones de manera independiente.



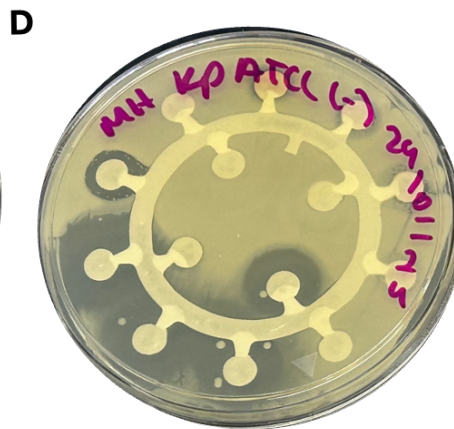
anti-OMVsATCC



anti-OMVs021



anti-OMVs003



NC

KpBUAP021

| Antibiótico | anti-OMVsATCC | anti-OMVs021 | anti-OMVs003 | NC |
|-------------|---------------|--------------|--------------|----|
| CAZ | R | R | R | R |
| OF | S | S | S | S |
| CD | R | R | R | R |
| FIX | R | R | R | R |
| NA | S | S | S | S |
| CRO | R | R | R | R |
| CTX | R | R | R | R |
| AT | R | R | R | R |
| NOR | S | S | S | S |
| ★ CI | R | R | R | I |
| AK | R | R | R | R |
| GM | R | R | R | R |
| XM | R | R | R | R |
| NI | R | R | R | R |

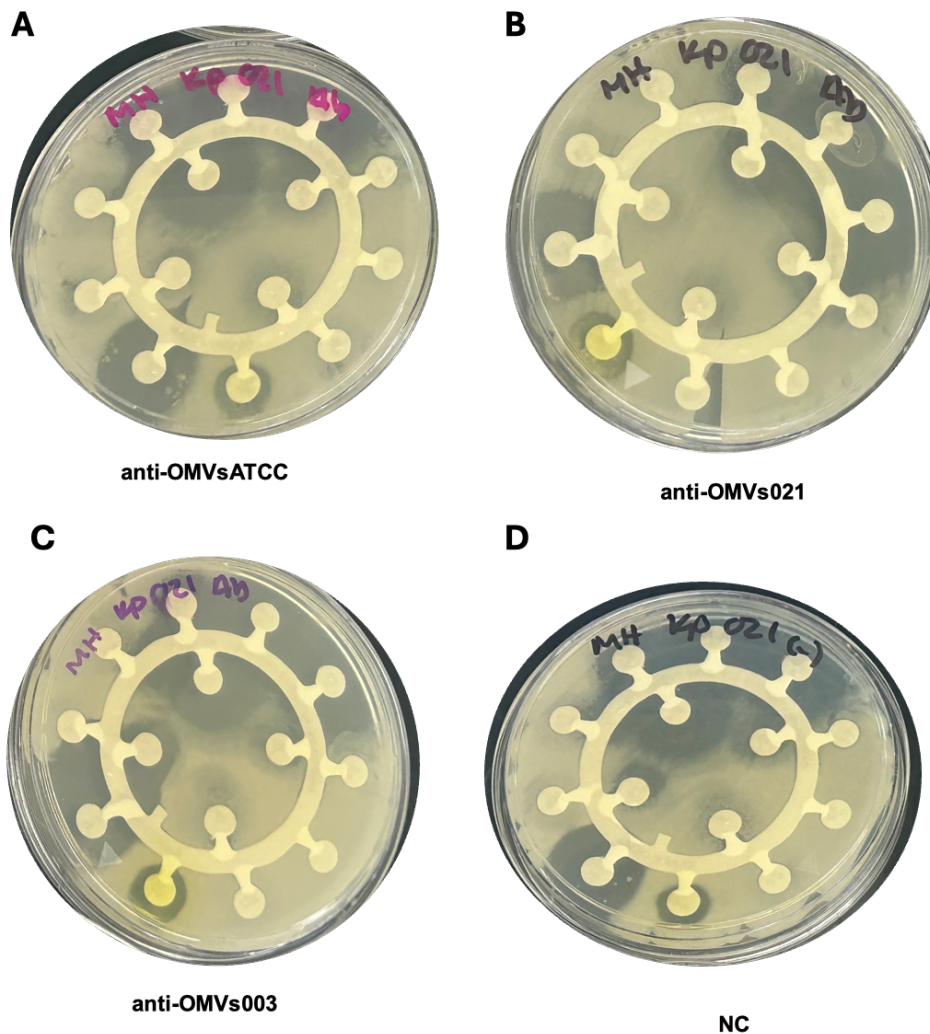
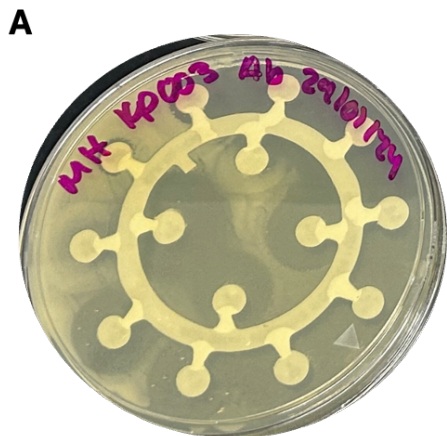


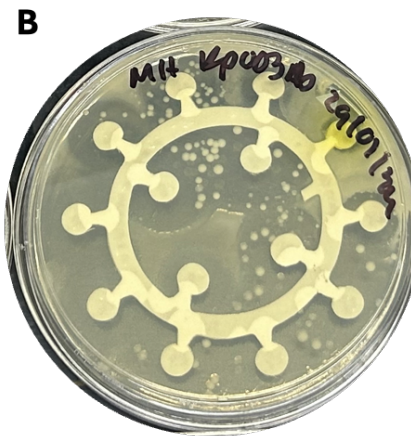
Figura 23. Perfil de sensibilidad de KpBUAP021 a antibióticos, tratada con anticuerpos anti-OMVs. Placa representativa de sensibilidad a antibióticos después de la incubación con anticuerpos A. anti-OMVsATCC. B. anti-OMVs021. C. anti-OMVs003. D. Control negativo (NC) sin tratamiento de anticuerpos. La tabla muestra la susceptibilidad o resistencia de la cepa a diversos antibióticos indicados en las filas, y los resultados están marcados por colores que representan resistencia [rojo, (R)], sensibilidad [verde, (S)] e intermedia [amarillo, (I)] de acuerdo con el CLSI 2024. En asterisco azul están resaltados aquellos antibióticos que cambiaron posterior a la interacción con los anticuerpos. Antibióticos utilizados: Cefotaxima-30 µg (CAZ), Ofloxacina-5 µg (OF), Cefdinir-5 µg (CD), Cefixima-5 µg (FIX), Ácido Nalidixico-30 µg (NA), Ceftriaxona-30 µg (CRO), Cefotaxima-30 µg (CTX), Aztreonam-30 µg (AT), Norfloxacin-10µg (NOR), Ciprofloxacina-5 µg (CI), Amikacina-30µg (AK), Gentamicina-10 µg (GM), Cefuroxima-30 µg (XM) y Nitrofurantoina-300 µg (NI). El ensayo se realizó en tres ocasiones de manera independiente.

KpBUAP003

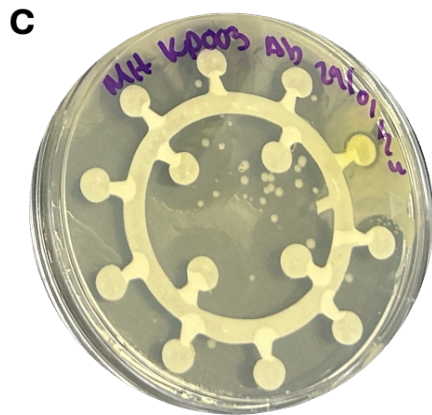
| Antibiótico | anti-OMVsATCC | anti-OMVs021 | anti-OMVs003 | NC |
|-------------|---------------|--------------|--------------|----|
| * CAZ | R | S | S | S |
| OF | S | S | S | S |
| * CD | I | I | I | R |
| FIX | S | S | S | S |
| NA | R | R | R | R |
| CRO | S | S | S | S |
| CTX | I | I | I | I |
| AT | S | S | S | S |
| NOR | S | S | S | S |
| CI | I | I | I | I |
| AK | R | R | R | R |
| GM | I | I | I | I |
| XM | R | R | R | R |
| NI | R | R | R | R |



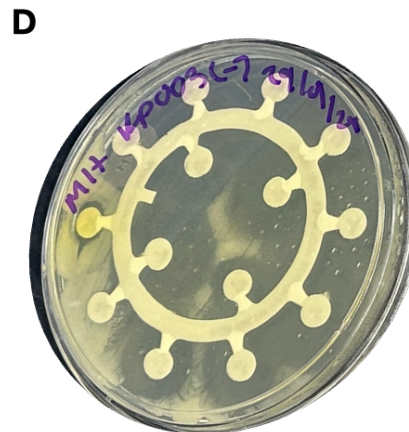
anti-OMVsATCC



anti-OMVs021



anti-OMVs003



NC

Figura 24. Perfil de sensibilidad de KpBUAP003 a antibióticos, tratada con anticuerpos anti-OMVs. Placa representativa de sensibilidad a antibióticos después de la incubación con anticuerpos A. anti-OMVsATCC. B. anti-OMVs021. C. anti-OMVs003. D. Control negativo (NC) sin tratamiento de anticuerpos. La tabla muestra la susceptibilidad o resistencia de la cepa a diversos antibióticos indicados en las filas, y los resultados están marcados por colores que representan resistencia [rojo, (R)], sensibilidad [verde, (S)] e intermedia [amarillo, (I)] de acuerdo con el CLSI 2024. En asterisco azul están resaltados aquellos antibióticos que cambiaron posterior a la interacción con los anticuerpos. Antibióticos utilizados: Ceftriaxona-30 µg (CAZ), Ofloxacina-5 µg (OF), Cefdinir-5 µg (CD), Cefixima-5 µg (FIX), Ácido Nalidixico-30 µg (NA), Ceftriaxona-30 µg (CRO), Cefotaxima-30 µg (CTX), Aztreonam-30 µg (AT), Norfloxacin-10µg (NOR), Ciprofloxacina-5 µg (CI), Amikacina-30µg (AK), Gentamicina-10 µg (GM), Cefuroxima-30 µg (XM) y Nitrofurantoina-300 µg (NI). El ensayo se realizó en tres ocasiones de manera independiente.

C. freundii

| Antibiótico | anti-OMVsATCC | anti-OMVs021 | anti-OMVs003 | NC |
|-------------|---------------|--------------|--------------|----|
| CAZ | R | R | R | R |
| *OF | S | S | S | R |
| CD | R | R | R | R |
| FIX | R | R | R | R |
| NA | R | R | R | R |
| CRO | R | R | R | R |
| CTX | R | R | R | R |
| AT | R | R | R | R |
| NOR | S | S | S | S |
| CI | I | I | I | I |
| AK | S | S | S | S |
| *GM | I | I | I | S |
| XM | R | R | R | R |
| NI | R | R | R | R |

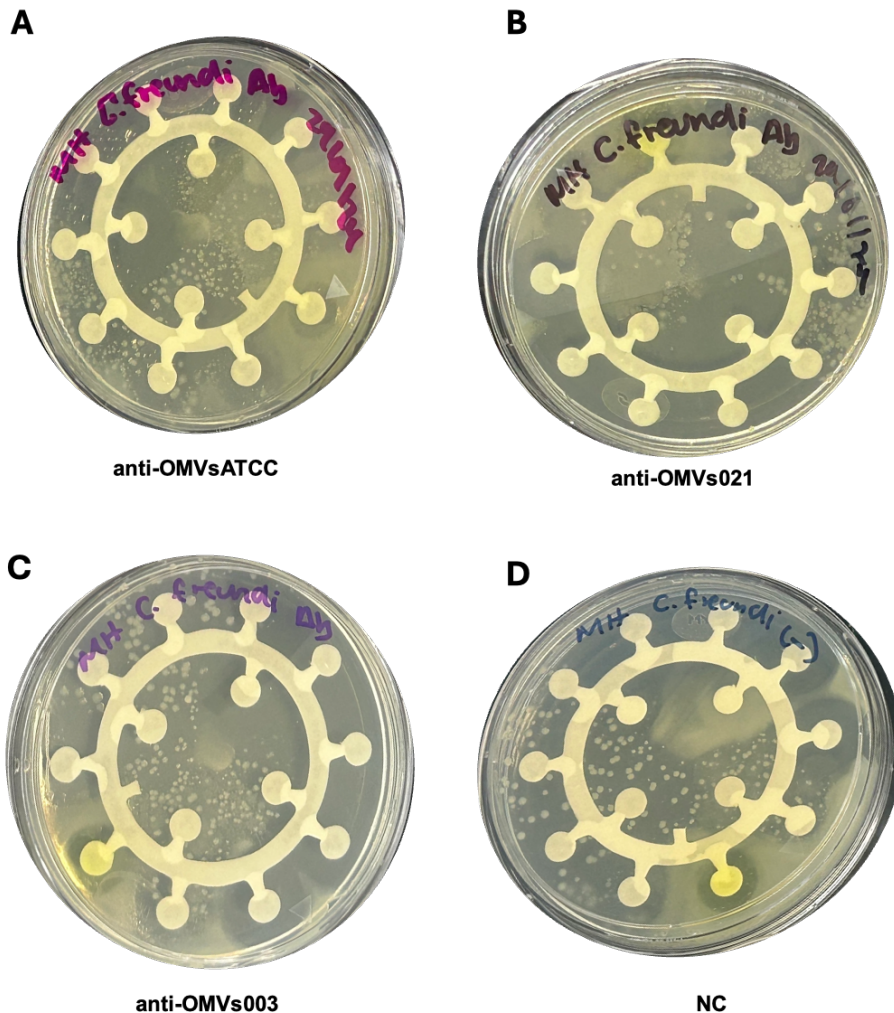


Figura 25. Perfil de sensibilidad de *Citrobacter freundii* a antibióticos, tratada con anticuerpos anti-OMVs. Placa representativa de sensibilidad a antibióticos después de la incubación con anticuerpos A. anti-OMVsATCC. B. anti-OMVs021. C. anti-OMVs003. D. Control negativo (NC) sin tratamiento de anticuerpos. La tabla muestra la susceptibilidad o resistencia de la cepa a diversos antibióticos indicados en las filas, y los resultados están marcados por colores que representan resistencia [rojo, (R)], sensibilidad [verde, (S)] e intermedia [amarillo, (I)] de acuerdo con el CLSI 2024. En asterisco azul están resaltados aquellos antibióticos que cambiaron posterior a la interacción con los anticuerpos. Antibióticos utilizados: Ceftazidima-30 µg (CAZ), Ofloxacina-5 µg (OF), Cefdinir-5 µg (CD), Cefixima-5 µg (FIX), Ácido Nalidixico-30 µg (NA), Ceftriaxona-30 µg (CRO), Cefotaxima-30 µg (CTX), Aztreonam-30 µg (AT), Norfloxacin-10µg (NOR), Ciprofloxacina-5 µg (CI), Amikacina-30µg (AK), Gentamicina-10 µg (GM), Cefuroxima-30 µg (XM) y Nitrofurantoina-300 µg (NI). El ensayo se realizó en tres ocasiones de manera independiente.

11.8 Alteración en la movilidad de *Klebsiella pneumoniae* mediada por los anticuerpos anti-OMVs

Los anticuerpos anti-OMVs presentes en el suero fueron previamente purificados mediante la precipitación con sulfato de amonio y la purificación se comprobó mediante títulos de anticuerpos con ensayos ELISA, SDS-PAGE al 12% y Western Blots (Anexos 12-14) esto con el fin de evitar interferencias por proteínas presentes en los sueros. Se utilizaron los controles de movilidad en agar blando al 0.3% (*E. coli* 2348/69 (O127:H6)-Control positivo; *E. coli* AGT01- Control negativo). Es importante recordar que estos ensayos se realizaron para observar la movilidad tipo “swarming” en las cinco cepas.

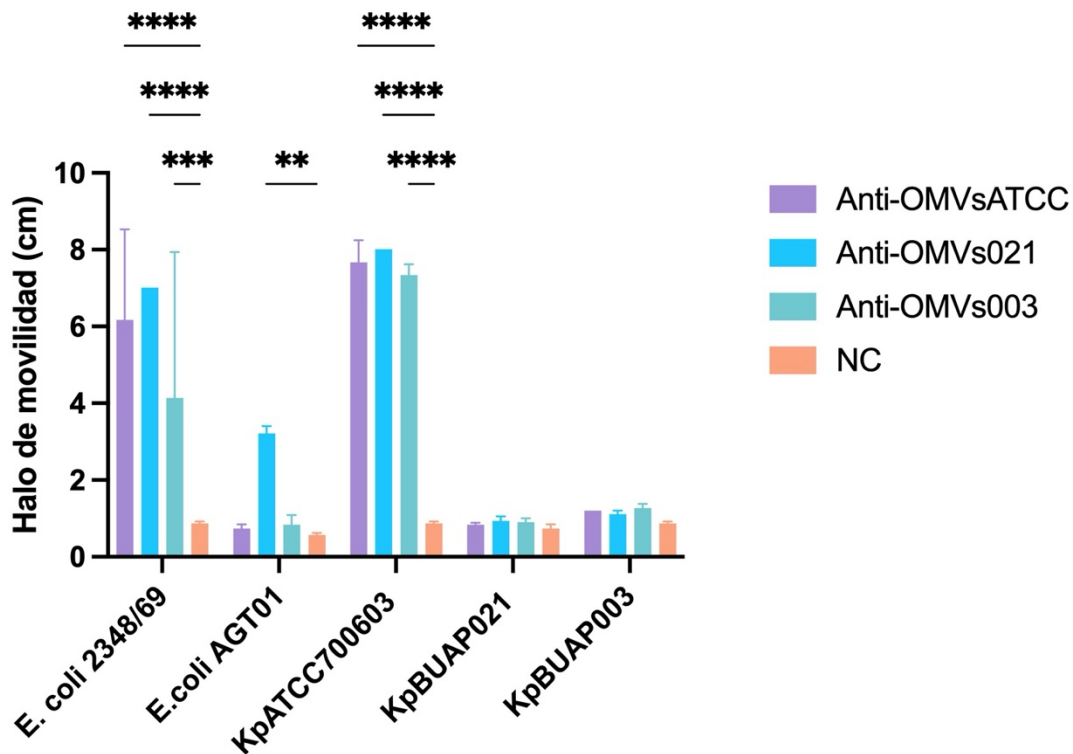


Figura 26. Evaluación de la movilidad bacteriana en presencia de anticuerpos anti-OMVs purificados. Las barras representan el halo de movilidad (cm) de las cepas tratadas con anticuerpos anti-OMVsATCC (morado), anti-OMVs021 (azul), anti-OMVs003 (verde) y un control negativo (NC) (naranja). Los datos se presentan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas posterior a un análisis estadístico de Two Way ANOVA en el programa de Prism 10 ($p=0.0086$ (**), $p=0.0010$ (***) , $p<0.0001$ (****)) comparadas con el control negativo de cada cepa.

En la Figura 26 se muestran los resultados de la influencia de los anticuerpos anti-OMVs que generan un aumento significativo en la movilidad de la cepa KpATCC700603 (Figura 27 C), al igual que nuestro control positivo para la movilidad (*E. coli* 2348/69) (Figura 27 A) y en nuestro control negativo de movilidad (*E. coli* AGT01) (Figura 27 B) el único aumento de movilidad observado fue con los anticuerpos anti-OMVs021; lo que sugiere que estos anticuerpos pueden tener un efecto estimulante sobre la movilidad de estas cepas. Por el contrario, no hubo cambios en las cepas KpBUAP021 y KpBUAP003 (Figura 27 D, E).

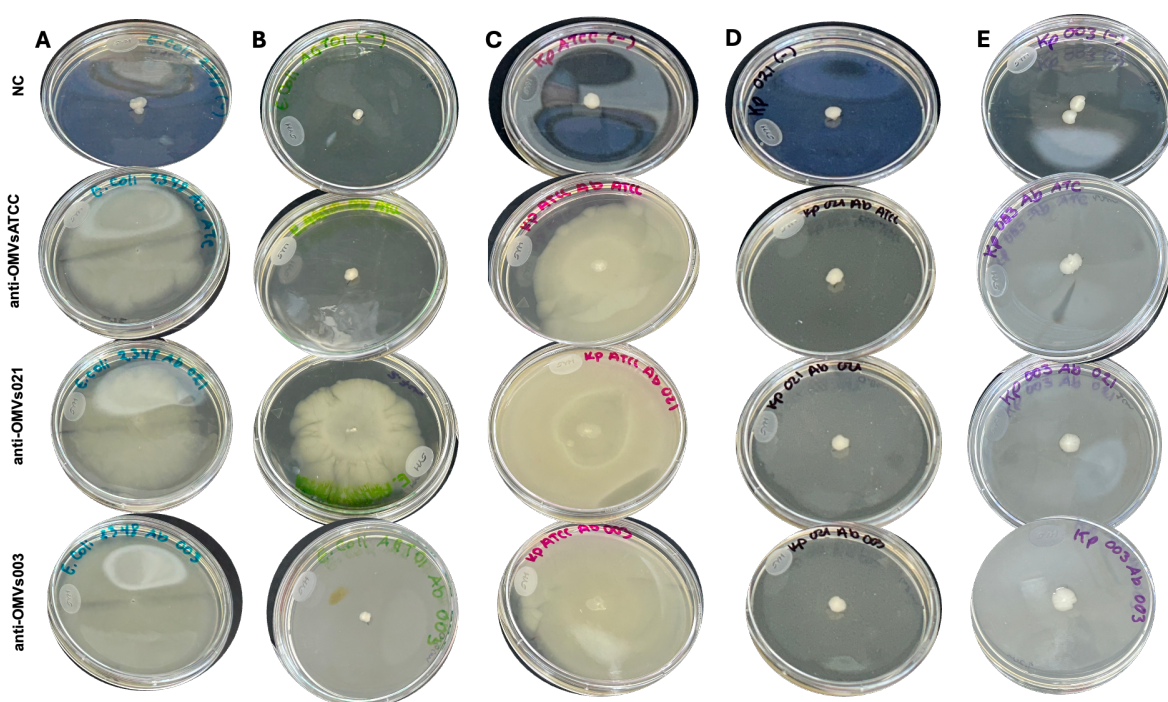


Figura 27. Placas de los ensayos de movilidad bacteriana en agar blando al 0.3% en presencia de anticuerpos anti-OMVs purificados. Se muestran imágenes representativas de los tres ensayos realizados con una picadura central y la movilidad observada fue a partir de la medición del halo de movilidad. A. *E. coli* 2348/69 (Control positivo). B. *E. coli* AGT01 (Control negativo). C. KpATCC700603. D. KpBUAP021. E. KpBUAP003. Al costado se menciona el anticuerpo utilizado para la interacción.

11.9 Análisis de la eficacia bactericida de los anticuerpos anti-OMVs purificados contra *K. pneumoniae*

La evaluación de la actividad bactericida de los anticuerpos anti-OMVs purificados (anti-OMVsATCC, anti-OMVs021, antiOMVs003) en cultivos frescos de su cepa homóloga (KpATCC700603, KpBUAP021, KpBUAP003) realizada en placas de 12 pozos permitió observar que para la cepa KpATCC700603 la interacción de los anticuerpos más complemento (C) mostró una disminución de UFC a los 15 minutos, mientras que con solo el complemento fue hasta los 30 minutos (Figura 28 A). En el caso de la cepa KpBUAP021, los anticuerpos más complemento provocaron una reducción desde el minuto 10 hasta el 25, en el cual fue el más significativo, aunque la viabilidad bacteriana aumentó posteriormente, superando al control negativo a esos mismos minutos (30-40); este fenómeno también se observó en la condición de solo complemento, donde la viabilidad bacteriana mostró fluctuaciones antes de recuperarse completamente. (Figura 28 B). Finalmente la cepa KpBUAP003 más los anticuerpos homólogos y complemento, presentó una disminución bacteriana en los minutos 15 y 20 pero la bacteria se recuperó a partir del minuto 25 y logró sobrevivir más en la condición de solo complemento, pues ahí la actividad bactericida se observa en el minuto 30 pero no dura mucho, superando la viabilidad observada en el control negativo a los 40 minutos. (Figura 28 C).

Estos hallazgos sugieren que los anticuerpos anti-OMVs (1:50) en combinación con complemento ejercen una actividad bactericida significativa. Continuando con los ensayos se observó que la viabilidad bacteriana tiende a recuperarse con el tiempo. Este comportamiento bactericida frente al crecimiento de *K. pneumoniae* indica una dependencia de la concentración de anticuerpo para maximizar este efecto.

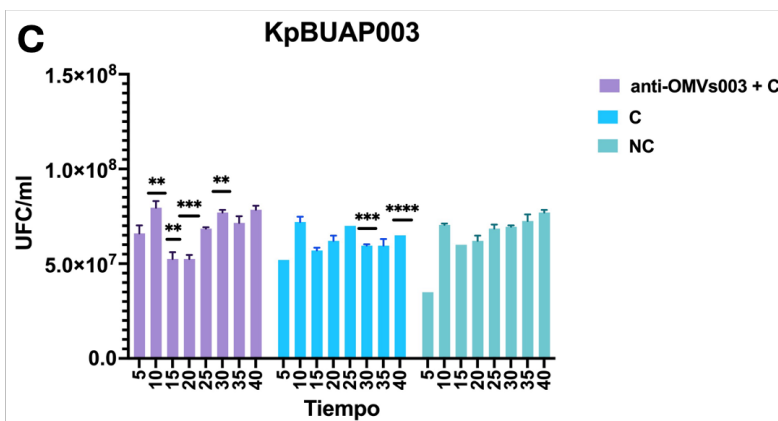
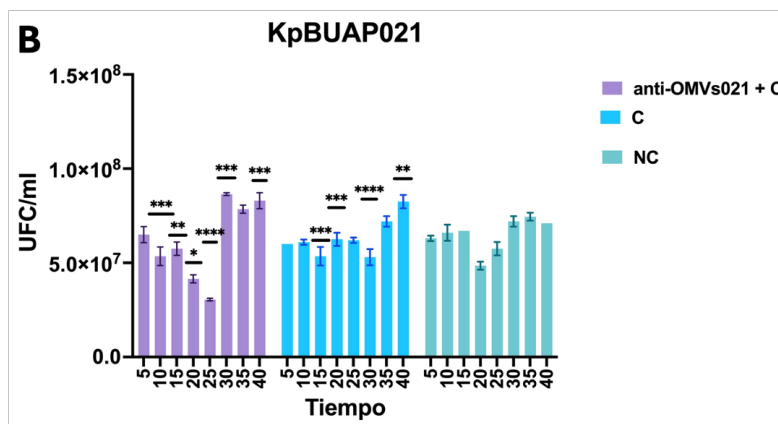
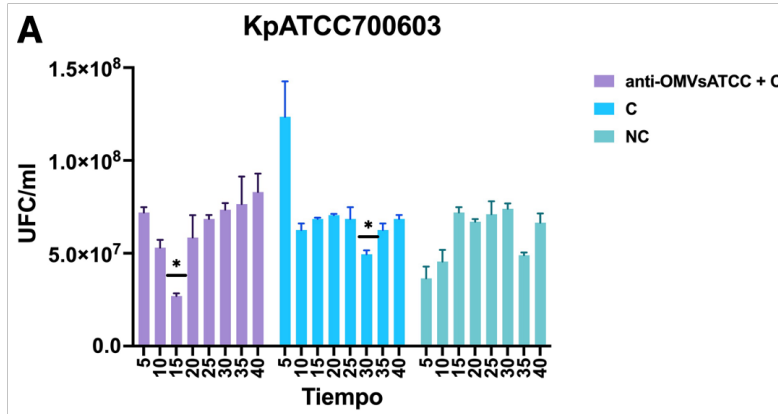


Figura 28. Determinación de la actividad bactericida de los anticuerpos anti-OMVs en *K. pneumoniae*. A. KpATCC700603 con anti-OMVsATCC. B. KpBUAP021 con anti-OMVs021. C. KpBUAP003 con anti-OMVs003. Las barras representan las UFC/ml en diferentes tiempos (5-40 min). Complemento (C), Control negativo (NC). Los datos se presentan como media \pm DE de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas posterior a un análisis estadístico de Two Way ANOVA en el programa de Prism 10 ($p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****)) comparadas con el control negativo de cada cepa.

12 Discusión

En bacterias gram-negativas, en 2023 se ha reportado una nueva clasificación de las vesículas de membrana (MV) de acuerdo con su mecanismo de formación: 1. el abultamiento de la membrana externa (MVs de tipo B) donde se incluyen las vesículas de membrana externa (OMVs), vesículas de membrana externa-interna (OIMVs) y vesículas de membrana citoplasmática (CMVs); y 2. la lisis celular explosiva o muerte celular por burbujeo (MVs de tipo E), que se dividen en vesículas de membrana de citocromo explosivo (ECMVs), vesículas de membrana externa explosiva (EOMVs), vesículas de membrana externa-interna explosiva (EOIMVs) (Xiu *et al.*, 2024, Wang *et al.*, 2024); por último el contenido (carga) presente en las MV también influye en la clasificación, como se observa en la Figura 29.

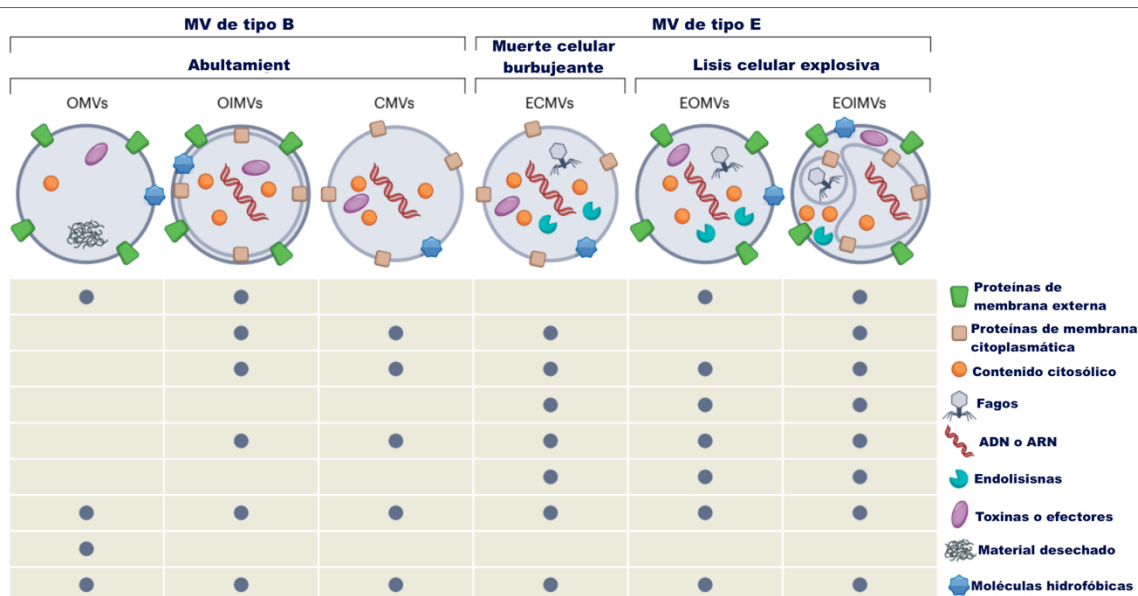


Figura 29. Clasificación de las MV de acuerdo a su biogénesis y composición. Modificado de Toyofuku *et al.*, 2023.

Dado lo anterior, las MVs observadas de KpBUAP021 y KpBUAP003 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figuras 8 y 9) pueden clasificarse como MV de tipo E, específicamente EOIMVs y EOMVs. Esta clasificación se basa en la presencia de más de una vesícula dentro de una vesícula más grande o vesículas internas de forma irregular (Toyofuku *et al.*, 2023) y en el tiempo de generación de estas MVs, ya que se ha reportado que, partir de las 12 hrs, las MVs comienzan a perder su forma y aumentar su tamaño debido al material electrodensito

en su interior (Baeza *et al.*, 2021). Esto se confirmó mediante el análisis del proteoma presente en las MVs, donde se identificaron 124 proteínas (Tabla 3) de origen citosólico, membrana plasmática, espacio extracelular y membrana externa (Figura 14), lo cual cumple con los requisitos para ser clasificadas como EOMVs y EIOMVs.

Un aspecto crucial para confirmar que estas microvesículas son de tipo E son los componentes relacionados a su patógenesis bacteriana (Płaczekiewicz *et al.*, 2023; Orench & Kuehn, 2021). De acuerdo con Fan y colaboradores (2024), las MVs de *K. pneumoniae* inducidas por antibióticos se secretan con proteínas y/o enzimas enriquecidas, que están relacionadas con el estrés, supervivencia bacteriana, metabolismo celular y factores de virulencia. Las MVs de las tres cepas analizadas (KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003) contienen proteínas con función *moonlighting* relacionadas con la evasión del sistema inmune (Anexos 15 y 16), así como factores de virulencia presentes (Anexo 17). Además, se identificaron proteínas involucradas en rutas como sistemas de secreción, movilidad, resistencia a antibióticos beta-lactámicos y metabolismo celular (Figura 15). Esta evidencia se recopiló a partir del análisis del proteoma de las MVs mediante MALDI-TOF/TOF, lo que respalda su clasificación como MVs de tipo E.

Una vez que se identificaron las proteínas presentes en las OMVs, era necesario identificar cuáles de estas proteínas estaban en mayor abundancia en las tres cepas con la finalidad de establecer si hay un cargo dirigido por la bacteria; por lo que el análisis del corrimiento de las proteínas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitió observar que 56 posibles proteínas eran predominantes en el bandeo. En las proteínas del primer bandeo (Tabla 4), región de 15 a 20 kDa, se encuentran proteínas con roles cruciales en las bacterias como: la síntesis de proteínas hasta la protección contra el estrés oxidativo, la regulación del metabolismo de la glucosa y se destaca una proteína con función *moonlighting* de chaperona (Tiol peroxidasa), dicha función es para mejorar la resistencia al choque térmico y estrés oxidativo (Jang *et al.*, 2004). En la región de 30-37 kDa (Tabla 5) encontramos proteínas con funciones que abarcan desde la generación de energía, transporte de nutrientes, biosíntesis de aminoácidos, modificación y regulación del

ARN, detoxificación, metabolismo de alcoholes y la comunicación celular, de igual forma, funciones *moonlighting* de unión al quinínogeno, unión a proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y vitronectina) (Kozik *et al.*, 2015) y a la mucina, esta última función también se ha encontrado tanto en la superficie bacteriana como en las MVs de *Bifidobacterium longum* que ayudan a promover su adhesión celular (Nishiyama *et al.*, 2020; González *et al.*, 2012); regulador transcripcional del metabolismo de la cisteína (CymR) (Hullo *et al.*, 2007); de unión a ARNm SCN1A del canal de sodio en *Homo sapiens* (Chen *et al.*, 2017); de unión a plasminógeno (Crowe *et al.*, 2003), Hsp60 (Jagadeesan *et al.*, 2010); función de helicasa de ARN (Shasmal *et al.*, 2016) y se destaca la enzima GAPDH que desempeña diversas funciones *moonlighting* como la unión a componentes de la matriz extracelular, regulación del sistema inmune, regulación genética, etc, (Kinoshita *et al.*, 2008; Katakura *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2005; Kinnby *et al.*, 2008; Gadahi *et al.*, 2016, Kim *et al.*, 2020). La zona de 40-50 kDa (Tabla 6) presenta proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, transporte y metabolismo de nutrientes, síntesis de ácidos grasos, protección contra el estrés oxidativo, y la síntesis y modificación de macromoléculas; y las proteínas *moonlighting* están ligadas con funciones como: unión a plasminógeno (Fulde *et al.*, 2014; Kinnby *et al.*, 2008; Candela *et al.*, 2009), mucina (Kesimer *et al.*, 2009), laminina (Agarwal *et al.*, 2008) y citoqueratina 8 (CK8) (Boleji *et al.*, 2011), inhibición de angiogénesis (Lay *et al.*, 2000), regulación del receptor de uroquinasa (Shetty *et al.*, 2004), interacción con filamentos de actina (Labroussaa *et al.*, 2010), inhibición de la actividad de diadenilato ciclasa (Gibhardt *et al.*, 2020), funciones de fusión de membrana y transporte de proteínas a las vacuolas (Decker *et al.*, 2006), control del ciclo celular (Bergé *et al.*, 2020), entre otras. En último lugar, en los pesos de 70-110 kDa (Tabla 7) se encuentran proteínas relacionadas con mantener la estructura celular, reparación y metabolismo celular, síntesis de proteínas y protección frente al estrés, con actividades *moonlighting* de unión a mucina y regulación transcripcional (Domain *et al.*, 2011). La principal abundancia de estas proteínas en las OMVs puede significar que *K. pneumoniae* aumenta su viabilidad empaquetando proteínas que le ayudan a activar respuestas protectoras o

aumentar su citotoxicidad frente a su hospedero, como se ha descrito en *E. coli* extra intestinal (ExPEC) (Jiang *et al.*, 2022), en *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fluorescens* (McMillan y Kuehn, 2023); no obstante se necesitan comprobar las funciones *moonlighting* en las proteínas de *K. pneumoniae* para demostrar esta idea.

Dado que las OMVs de KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 contienen proteínas relevantes, como las identificadas en nuestro análisis, la inmunización en el modelo murino BALB/c, fue realizada para evaluar la respuesta inmune generada y determinar los inmunógenos presentes. Los resultados mostraron que las OMVs de las tres cepas de *K. pneumoniae* junto con el adyuvante (TiterMax®) (Figura 12 A-C) son capaces de producir anticuerpos anti-OMVs más altos que sin el adyuvante (Figura 12 D); sin embargo, el hecho de que las OMVs sin adyuvante son capaces de inducir la producción de anticuerpos, las OMVs de *K. pneumoniae* probablemente pueden funcionar como adyuvantes por si solas, ya que se observó la producción de anticuerpos anti-OMVs, lo que puede implicar que, gracias a su tamaño pueden pasar por la vía linfática y ser transportadas por células presentadoras de antígeno (APC). Además es probable que sean menos tóxicas y que se permita su uso para el desarrollo de adyuvantes por su potencial inmunogénico intrínseco como se ha reportado (Xiao y Yang, 2023). El esquema de inmunización, permitió un aumento progresivo en la concentración de anticuerpos, donde el grupo OMVs021 fue el más efectivo (dilución de 1:3200 en la semana 2), mientras el grupo OMVs003 solamente alcanzó un título de 1:400. Estas diferencias pueden ser debido a las variaciones en la composición de las OMVs (Furuyama y Sircili, 2021), la capacidad de las MVs de estimular las células inmunitarias y la eficiencia de la presentación de sus antígenos (Cai *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2024). Por consiguiente, observar la producción de anticuerpos anti-OMVs, indicaría interacciones entre las células B y células T helper, mediadas por el MHC, puesto que las células B presentan el antígeno en moléculas del MHC-II, que son reconocidas por las células T helper, lo que llevó a la proliferación y diferenciación de las células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Esto se ha reportado debido a que las OMVs contienen epítomos

que se presentan en el contexto MHC-II para estimular células CD4+, produciendo anticuerpos incluso con concentraciones bajas de antígenos (Croia *et al.*, 2023). Por último, se demostró que la cepa control *K. pneumoniae* ATCC700603, comúnmente utilizada para la susceptibilidad antibiótica (CLSI, 2024; Sharma *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024), o como bacteria aceptora de OMVs (Tang *et al.*, 2023; Hua *et al.*, 2022, Li *et al.*, 2022), también puede producir MVs que inducen una respuesta inmune humoral en el modelo BALB/c, lo que abre nuevas oportunidades para estudiar las propiedades inmunogénicas de OMVs derivadas de cepas de referencia mundial.

Existe una variabilidad en los isotipos de anticuerpos a lo largo de la inmunización (Figura 13), lo que refleja cambios en la inmunogenicidad generados por las MVs de las tres cepas de *K. pneumoniae*. Se observa un aumento en la concentración de los anti-OMVs; específicamente, los niveles de isotipos en los grupos OMVsATCC, OMVs021 y OMVs021AI (Figura 13 A, B, D) fueron superiores a los de OMVs003 (Figura 13 C), sugiriendo que son menos inmunogénicas debido al contenido del cargo de las OMVs. En la semana 7, el isotipo IgG3 presentó una mayor predominancia en los grupos OMVsATCC y OMVs021, mientras que en los grupos OMVs003 y OMVs021AI predominó el isotipo IgG2b. Se ha descrito que el isotipo IgG3 tiene funciones de protección contra *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, como una unión al polisacárido capsular, una capacidad aglutinante, actividad bactericida sérica mediada por complemento y promover la muerte de la bacteria mediada por neutrófilos (Motley *et al.*, 2020). Del mismo modo, este isotipo, en humanos presenta respuestas contra proteínas (+++) y polisacáridos (+/-), componentes de las MVs y la activación del complemento por la unión a C1q (Vidarsson *et al.*, 2014).

Un resultado interesante es que el grupo OMVs003, el isotipo dominante cambió de IgG3 en la semana 4 a IgG2b en la semana 7, acompañado por la presencia de múltiples isotipos (Figura 13 C). Lo que sugiere que podría existir un cambio en la respuesta inmunológica a lo largo del tiempo, posiblemente influenciado por la maduración de la respuesta inmune o la liberación lenta de los antígenos presentes en las OMVs, que los protegen de la degradación (Chbib *et al.*, 2021; Zingl *et al.*,

2021). Estos resultados destacan la importancia de los isotipos de los anti-OMVs como posibles indicadores del tipo de respuesta inmune esperada por las OMVs de *K. pneumoniae*, porque la especificidad en cada fase indica la complejidad de la respuesta inmune humoral frente a las MVs.

Para continuar identificando la inmunogenicidad de las proteínas presentes en las microvesículas, se realizaron los ensayos de Western blot, los cuales revelaron la presencia de bandas específicas en las transferencias, con dos bandas principales observadas para los anticuerpos anti-OMVsATCC y anti-OMVs021. Bandas aproximadamente de 50 kDa y entre 30-37 kDa para los anti-OMVATCC (Figura 17 A, B), y de 75 kDa y entre 30-37 kDa para los anti-OMVs021 (Figuras 17 C,D), que sugieren antígenos específicos como las siguientes proteínas candidatas: proteína similar fimbrial (A0A0H3GX74), catalasa-peroxidasa (CP) (A0A0H3GQ65), transportador de vitamina B12 (BtuB) (A0A0H3GKA3), glutatión disulfuro reductasa (A0A0H3H498) y subunidad transportadora de D-ribosa (RbsB) (A0A0H3GGS8); con un potencial inmunogénico, las cuales podrían ser capaces de inducir respuestas inmunes específicas. La localización de estas proteínas en la bacteria es destacado, ya que dos son del citosol, una de la membrana externa, una del periplasma y una fimbrial; y se ha reportado que proteínas de membrana externa, del periplasma y lipoproteínas pueden ser inmunogénicas y proporcionar protección frente al antígeno presentado (Hu *et al.*, 2022; Croia *et al.*, 2023; Viviani *et al.*, 2023). Sin embargo, la mayoría de las proteínas identificadas en el gel de poliacrilamida no mostraron reactividad con los anticuerpos anti-OMVs, lo que sugiere que no todas las proteínas presentes en las MVs contribuyen a la producción de anticuerpos anti-OMVs debido a su localización en la membrana o periplasma.

El análisis de inmunofluorescencia que se realizó, permitió observar la interacción directa de los anticuerpos anti-OMVsATCC, anti-OMVs021 y anti-OMVs003 con sus cepas homólogas (Figuras 19-21). Por ejemplo en las cepas KpATCC700603 y KpBUAP003, la marca demostró una localización polar, lo que puede sugerir la presencia de proteínas inmunogénicas con epítopes específicos en la zona de los polos de las células bacterianas y que puede estar relacionado a funciones como la

división o la movilidad. En contraste la cepa KpBUAP021 mostró una marca fluorescente alrededor de la bacteria, lo que podría indicar una distribución uniforme en la superficie celular que presumiblemente esté relacionado con estructuras como la cápsula o el lipopolisacárido. Conjuntamente, el hecho que los anticuerpos anti-OMVs permitieran observar un patrón de MVs en cada cepa, podría determinar que a partir de inmunofluorescencias se podría diferenciar el contenido de las mismas, puesto que se ha demostrado que esta técnica permite detectar variaciones en el tamaño y marcadores de superficie, facilitando la caracterización de las OMVs (Singh *et al.*, 2024).

Como se ha descrito anteriormente, las OMVs son capaces de transferir genes y/o proteínas de resistencia a los antibióticos entre la misma o diferente especie (Shen *et al.*, 2024). Se ha propuesto que los anticuerpos sean una alternativa para combatir este problema, sobretodo en infecciones asociadas a la salud (La Guidara *et al.*, 2024), específicamente los anti-OMVs (Wu *et al.*, 2020), debido a que se ha reportado que la combinación de anticuerpos anti-OMVs más antibióticos aumentan la susceptibilidad de las bacterias (quinolonas) (Cai *et al.*, 2018). En este estudio, los resultados de los antibiogramas con la interacción de antibióticos más anti-OMVs muestran diferencias en los patrones de sensibilidad. Para la cepa KpATCC700603 (Figura 22), se observaron variaciones dependiendo del tipo de anti-OMVs utilizado. La interacción con su anticuerpo homólogo mostró un aumento en la sensibilidad a OF, lo que contrasta con la interacción del anti-OMVs003, que resultó en resistencia. Lo mismo sucedió con NOR, donde los anti-OMVsATCC indujeron resistencia. Estos resultados sugieren que su uso contra el OF sea beneficioso, a la cual *K. pneumoniae* presenta una resistencia (Chung *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020) pero con los anticuerpos anti-OMVs003 no, puesto que es probable que las OMVs de KpBUAP003, las cuales se generaron esos anticuerpos, no tuvieron el reconocimiento de los antígenos de esas estructuras y por lo tanto se presente una resistencia al mismo antibiótico pero con diferente anticuerpo; o bien como el caso NOR, la diferencia puede ser por que la interacción entre estos dos antibióticos (NOR y OF) y las estructuras de la membrana sea diferente. Para la cepa KpBUAP021 (Figura 23), se observó un cambio notable en la susceptibilidad a la

CI, donde los tres tipos de anticuerpos generaron resistencia, un cambio relevante comparado con la sensibilidad intermedia del control. Este hallazgo indica nuevamente que, la influencia de los anticuerpos pueden intervenir en la expresión o función de las bombas de eflujo o en las proteínas de porinas al interactuar con ella y por lo tanto modificar la permeabilidad de la membrana bacteriana (Lei *et al.*, 2024). Y la cepa KpBUAP003 (Figura 24) mostró una transición de sensibilidad a resistencia frente a CAZ tras la interacción con anti-OMVsATCC. Así mismo, los tres anticuerpos indujeron una sensibilidad intermedia a la CD. En el caso de *C. freundii* (Figura 25), los cambios de susceptibilidad fueron más uniformes, independientemente del tipo anti-OMVs, pero dependiente del antibiótico. Se observó un aumento de sensibilidad a OF mientras que la sensibilidad a la GM disminuyó, resultando en resistencia intermedia.

En general, los anticuerpos anti-OMVsATCC provocaron cambios en la susceptibilidad bacteriana a una variedad de antibióticos de diferentes clases, incluyendo quinolonas (OF, CI, NOR), aminoglucósidos (AK, GM) y cefalosporinas (CD, CAZ). Esto subraya su potencial influencia en la dinámica de resistencia. Los anti-OMVs021 y anti-OMVs003 también afectaron la susceptibilidad, aunque de manera menos pronunciada; si lo relacionamos con las posibles proteínas inmunógenicas que reconocen los anti-OMVs, la proteína similar fimbrial cuando esta sobreexpresada podría estar asociada a la resistencia a las fluoroquinolonas (CI-32 veces, NOR-128 veces, OF) (Uddin *et al.*, 2019) por lo que la inhibición de estas proteínas puede desencadenar la susceptibilidad a los antibióticos; la proteína catalasa-peroxidasa y la proteína glutatión disulfuro reductasa son proteínas con función antioxidante, y puede ser que los anticuerpos no esten logrando neutralizarlas por su localización, por lo que *K. pneumoniae* mantiene su resistencia al estrés oxidativo inducido por los antibióticos (Yang *et al.*, 2019), lo mismo pasaría con la subunidad transportadora de D-ribosa, los anti-OMVs no podrían reconocer el antígeno y la célula mantendría su metabolismo energético, de lo contrario su supervivencia se vería comprometida (Pareek *et al.*, 2021); por el contrario si existiera una interacción directa con el transportador de vitamina B12 puede alterar

la homeostasis celular, generando que la bacteria no responda a daños por los antibióticos (Lathrop *et al.*, 1995; Menikpurage *et al.*, 2019).

Desde otra perspectiva, la presencia de cepas productoras de OMVs con antígenos capaces de generar anticuerpos anti-OMVs debe ser estudiada más a detalle para seleccionar el correcto tratamiento antibacteriano, ya que, así como se observaron cambios en la susceptibilidad posterior a la interacción con los anticuerpos anti-OMVs, existen antibióticos a los cuales *K. pneumoniae* es sensible, aún cuando interaccionaron con los anticuerpos anti-OMVs esa sensibilidad se mantuvo, sugiriendo una opción terapéutica.

Una vez observado que los anticuerpos pueden generar cambios en la supervivencia de *K. pneumoniae* y sabiendo que puede ser una bacteria móvil dependiendo del ambiente, los ensayos de movilidad reflejaron un efecto interesante, pero antes de realizarlos, la purificación de los anticuerpos anti-OMVs a través de la precipitación con sulfato de amonio, verificada mediante ensayos ELISA, SDS-PAGE al 12% y Western blot (Anexos 12-14), fue crucial para asegurar la especificidad en los ensayos de movilidad sin interferencias por contaminantes propios de los sueros. Los controles de movilidad en agar blando al 0.3%, utilizando *E. coli* 2348/69 (O127:H6) como control positivo y *E. coli* AGT01 como control negativo, permitieron evaluar la movilidad “swarming” en las cepas de *K. pneumoniae* estudiadas.

Los resultados mostrados en la Figura 26 señalan que los anti-OMVs provocaron un aumento significativo en la movilidad de la cepa KpATCC700603 (Figura 27 C), similar al efecto observado en el control positivo de movilidad (Figura 27 A). Curiosamente, en el control negativo de movilidad (*E. coli* AGT01), se observó un incremento de movilidad únicamente en presencia de anticuerpos anti-OMVs021 (Figura 27 B) lo que sugiere que se presenta una movilidad de tipo “swarming” por los patrones de colonias distinguidos: “dendritas” (Figura 27 B), “patrón de ojo de buey” (Figura 27 C) y “enjambre sin rasgos” (Figura 27 A), también observados en bacterias como *Bacillus subtilis* str 3610, *Proteus mirabilis* str PM7002 y *Pseudomonas aeruginosa* str. PA14 (Keams, 2010), lo que sugiere que estos anticuerpos pueden tener un efecto específico estimulante sobre la movilidad de

estas cepas, ya que para que se desarrolle esta movilidad se requieren de estímulos necesarios que responden al ambiente, densidad bacteriana y señales fisiológicas (Zegadło *et al.*, 2023), lo que posiblemente pase es que los anti-OMVs reconozcan el inmunógeno de la proteína RbsB o BtuB y *K. pneumoniae* tenga que ajustar su metabolismo o bien que este existiendo una interacción de los anti-OMVs con el lipopolisacárido (LPS) por el isotipo presente en los anticuerpos (IgG3) y active la producción de flagelos, debido al patrón observado en KpATCC700603, un crecimiento en zonas con círculos periféricos que generan el fenómeno de enjambre causado por el LPS, que lo facilita (Toguchi *et al.*, 2000). En contraste, las cepas KpBUAP021 y KpBUAP003 no mostraron cambios en su movilidad (Figura 27 D, E), lo cual podría indicar que la respuesta de movilidad depende de la interacción específica entre los anticuerpos y los antígenos presentes de cada cepa.

Por último, los experimentos para evaluar la actividad bactericida de los anticuerpos anti-OMVs purificados frente a sus cepas homólogas, revelaron patrones de eficacia variables en función del tiempo y la combinación del complemento (suero preinmune). En el caso de KpATCC700603, se observó una disminución rápida de la viabilidad bacteriana a los 15 minutos cuando se usaron anticuerpos en combinación con el complemento, mientras que con solo el complemento, esta disminución se produjo a los 30 minutos (Figura 28 A). Esto indica que los anticuerpos pueden acelerar la actividad bactericida del complemento en esta cepa. Para la cepa KpBUAP021, la combinación de anticuerpos y complemento mostró una reducción de la viabilidad bacteriana desde el minuto 10, alcanzando su punto más alto a los 25 minutos. Sin embargo, se observó un aumento posterior cuando se dio más tiempo para la recuperación de las bacterias, superando incluso al control negativo entre los 30 y 40 minutos (Figura 28 B). Un comportamiento similar se presentó en la condición de solo complemento, con fluctuaciones en la viabilidad antes de su completa recuperación. En la cepa KpBUAP003, los anticuerpos homólogos con complemento provocaron una disminución bacteriana a los 15 y 20 minutos, aunque la viabilidad se recuperó a partir del minuto 25. En la condición de solo complemento, la actividad bactericida se observó a los 30 minutos, pero no fue duradera, superando el control negativo a los 40 minutos (Figura 28 C). Estos

resultados sugieren que, aunque los anticuerpos anti-OMVs (1:50) combinados con complemento pueden inducir una actividad bactericida, no logran eliminar por completo a *K. pneumoniae* ya que tiende a recuperarse con el tiempo de incubación. Este comportamiento se ha descrito, ya que aunque el sistema de complemento es eficaz, este patógeno desarrolla estrategias para evadirlo, como el desarrollo de LPS liso que provoca una menor activación de la vía clásica (Opoku *et al.*, 2022), pero que probablemente pueda ser reconocido por los anti-OMVs y por eso existe una disminución en la carga bacteriana al menos por unos minutos. Otro componente que le permite tener resistencia al complemento es la cápsula (Doorfujin *et al.*, 2016) y se ha descrito que las OMVs pueden contener componentes de la cápsula como polisacáridos (no analizados en el presente estudio), tal vez se hayan generado anticuerpos anti-OMVs para antígenos cápsulares (Lei *et al.*, 2024) pero que *K. pneumoniae* al poseer genes de modificación cápsular, los puede estar activando o empaquetando más LPS reconocido en las MVs, es decir utilizarlas como “anzuelo” y así superar la actividad bactericida por parte de los anticuerpos, que activaron el complemento por un tiempo corto. Por esta razón es necesario seleccionar adecuadamente los posibles antígenos que generan la resistencia al suero, realizar mutaciones y empaquetarlos en las MVs para que la producción de anticuerpos anti-OMVs más el complemento puedan tener una función efectiva frente a este patógeno (König *et al.*, 2021), ya que se ha comprobado que los anti-OMVs mejoran la actividad bactericida (Huang *et al.*, 2022; Vázquez *et al.*, 2023). Asimismo, es necesario aumentar el porcentaje del complemento del 12.5% a 20 o 50%, ya que en *Klebsiella*, este porcentaje no inhibe el crecimiento bacteriano (Kawser y Shamsuzzaman, 2021; Soto *et al.*, 2016).

13 Conclusión

La purificación y caracterización de las vesículas de membrana secretadas por *K. pneumoniae* permite sugerir que son capaces de inducir una respuesta inmune humoral en un modelo murino.

De acuerdo con lo observado mediante microscopía electrónica de transmisión y su análisis proteómico se identificó su estructura interna y la presencia de múltiples proteínas de origen citosólico, de membrana externa y membrana plasmática. Por lo que las microvesículas (MVs) de las cepas KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 de *K. pneumoniae* son vesículas de tipo E, específicamente vesículas de membrana externa explosiva (EOMVs) y vesículas de membrana externa-interna explosiva (EIOMVs). Esto es destacable, ya que dentro de las proteínas empaquetadas en las MV, pueden tener funciones *moonlighting*, que incluyen la evasión del sistema inmune y virulencia.

Aunque se ha descrito previamente en otras *Enterobacterales* pero no específicamente en proteínas de *K. pneumoniae*, se puede sugerir que este microorganismo utiliza estas vesículas para incrementar su viabilidad en un ambiente hostil.

La inmunización con las OMVs en el modelo murino BALB/c mostró una respuesta inmune humoral, evidenciada por la producción de anticuerpos anti-OMVs, especialmente cuando se utilizó un adyuvante. Las diferencias en la concentración de los anticuerpos y los isotipos predominantes entre los grupos de inmunización, sugieren una diferencia en la inmunogenicidad de los antígenos presentes en las MVs de las tres cepas de *K. pneumoniae*, sin embargo la cepa KpBUAP021 presentó un mayor potencial inmunogénico. Este hallazgo puede relacionarse con las variaciones en el cargo proteico y la eficacia en la presentación de antígenos en superficie de las OMVs, así como su liberación, promoviendo una respuesta inmune prolongada, observándose en los títulos (1:3200) e isotipos (IgG3) de la semana 7, dos semanas después de que se terminara el esquema de inmunización.

Los ensayos tipo “Western blot” confirmaron la inmunogenicidad de proteínas presentes en los extractos proteicos totales de las OMVs, destacando la proteína similar fimbrial, la catalasa-peroxidasa, el transportador de vitamina B12, y otras, como antígenos potenciales para futuras investigaciones. Estas proteínas, por su ubicación y función, podrían ser candidatas prometedoras para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación o diagnóstico.

Los resultados obtenidos a partir de la interacción de los anticuerpos anti-OMVs, los antibióticos y *K. pneumoniae* demostraron que existe un cambio en la susceptibilidad a diversos antibióticos según el tipo de anti-OMVs utilizado. Esta interacción resalta el potencial de los anticuerpos como una posible ayuda en el tratamiento de las infecciones asociadas a la salud, ya que se puede determinar cuál de ellos aumenta la susceptibilidad bacteriana y en cuál no existe un cambio, específicamente en cepas resistentes a fluoroquinolonas.

Además, los experimentos de movilidad revelaron que los anticuerpos pueden influir en la movilidad de ciertas cepas de *K. pneumoniae*, promoviendo posiblemente la movilidad tipo “swarming” en la cepa KpATCC700603. Este efecto podría relacionarse con la interacción de los anti-OMVs y componentes específicos de la superficie bacteriana como el LPS, y sugiere que esta regulación en la movilidad puede ser una estrategia de *K. pneumoniae* frente a la presencia de anticuerpos anti-OMVs.

Por último, la evaluación de la actividad bactericida de los anticuerpos en combinación con el complemento (suero preinmune), indicó una disminución de la viabilidad bacteriana en cepas homólogas, seguida de una recuperación en la viabilidad de *Klebsiella* cuando se dejó a mayores tiempos de incubación. Este fenómeno sugiere que, aunque los anticuerpos pueden potenciar la acción del complemento, las tres cepas KpATCC700603, KpBUAP021 y KpBUAP003 poseen mecanismos de evasión que limitan la actividad del complemento a largo plazo. Por lo tanto, es importante identificar y caracterizar los antígenos claves presentes en las MVs que pueden ser blanco de una mejor actividad bactericida.

Finalmente, la investigación realizada cumple con el objetivo de analizar la respuesta inmune humoral generada por las OMVs purificadas y determinar su impacto en la patogenicidad de *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para optimizar la generación de anticuerpos anti-OMVs y su combinación con agentes complementarios, con el fin de maximizar su eficacia y reducir los casos altos de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS).

14 Futuras líneas de Investigación

- Investigar los diferentes componentes inmunógenicos (lípidos, carbohidratos, material genético, etc) empaquetados en las OMVs y complementarlo con la proteómica obtenida.
- Investigar los antígenos conservados, específicamente las posibles proteínas de ~30-37 kDa, que parecen estar conservadas en las MVs y los extractos bacterianos de todas las cepas. Esto incluiría determinar su estructura, función y potencial inmunogénico.
- Profundizar en la efectividad de los diferentes isotipos de anticuerpos generados en respuesta a las OMVs con el fin de comprender los mecanismos que causan dicha variación.
- Estudiar el posible efecto sinérgico de los anti-OMVs más antibióticos a diferentes concentraciones y técnicas de susceptibilidad.
- Analizar más detalladamente cómo los anticuerpos anti-OMVs influyen en la movilidad bacteriana, estudiar la morfología y fondo genético de las cepas posterior a la interacción.
- Optimizar la actividad bactericida de los anticuerpos, utilizando diferentes concentraciones, tiempos y aumentar la concentración del complemento para superar la recuperación de la viabilidad bacteriana observada.

15 Bibliografía

- Agarwal, S., Kulshreshtha, P., Mukku, D. B., & Bhatnagar, R. (2008). α -Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(7-8), 986-994.
- Araque, M., Varela, Y. Y., & Labrador, I. (2019). Fenotipo hipermucoviscoso de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta: Lo nuevo de un viejo enemigo. *Avances en Biomedicina*, 8(1), 21-29.
- Assoni, L., Girardello, R., Converso, T. R., & Darrieux, M. (2021). Current stage in the development of *Klebsiella pneumoniae* vaccines. *Infectious Diseases and Therapy*, 10(4), 2157-2175.
- Azargun, R., Gholizadeh, P., Sadeghi, V., Hosainzadegan, H., Tarhriz, V., Memar, M. Y., ... & Eyvazi, S. (2020). Molecular mechanisms associated with quinolone resistance in *Enterobacteriaceae*: review and update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 114(10), 770-781.
- Azmi, A., & Mohammad, R. M. (Eds.). (2019). *Animal Models in Cancer Drug Discovery*. Academic Press.
- Barrera-Rojas, J., de la Vara, L. G., Ríos-Castro, E., Leyva-Castillo, L. E., & Gómez-Lojero, C. (2018). The distribution of divinyl chlorophylls a and b and the presence of ferredoxin-NADP⁺ reductase in *Prochlorococcus marinus* MIT9313 thylakoid membranes. *Heliyon*, 4(12).
- Baeza, N., Delgado, L., Comas, J., & Mercade, E. (2021). Phage-mediated explosive cell lysis induces the formation of a different type of O-IMV in *Shewanella vesiculosa* M7T. *Frontiers in Microbiology*, 12, 713669.
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, 43(2), 123-144.
- Bergé, M., Pezzatti, J., González-Ruiz, V., Degeorges, L., Mottet-Osman, G., Rudaz, S., & Viollier, P. H. (2020). Bacterial cell cycle control by citrate synthase independent of enzymatic activity. *Elife*, 9, e52272.

- Bielaszewska, M., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Jarosch, K. A., Steil, D., ... & Karch, H. (2017). Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: Intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006159.
- Blancá, B., Alvarez Hayes, J., Surmann, K., Hugo, V., Hentschker, C., Lamberti, Y., ... & Rodriguez, M. E. (2022). *Bordetella pertussis* outer membrane vesicles as virulence factor vehicles that influence bacterial interaction with macrophages. *Pathogens and Disease*, 80(1), ftac031.
- Blue, D. E., & Schmitt, B. H. (2016). Microbiology for the surgical pathologist. In *Essentials of anatomic pathology* (pp. 349-442). Springer, Cham.
- Boleij, A., Laarakkers, C. M., Gloerich, J., Swinkels, D. W., & Tjalsma, H. (2011). Surface-affinity profiling to identify host-pathogen interactions. *Infection and immunity*, 79(12), 4777-4783.
- Bottero, D., Zurita, M. E., Gaillard, M. E., Carriquiriborde, F., Martin Aispuro, P., Elizagaray, M., ... & Hozbor, D. (2018). Outer-membrane-vesicle-associated O antigen, a crucial component for protecting against *Bordetella parapertussis* infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 2501.
- Brenner, D. J., & Farmer III, J. J. (2015). *Enterobacteriaceae*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-24.
- Briongos-Figuero, L. S., Gómez-Traveso, T., Bachiller-Luque, P., Domínguez-Gil González, M., Gómez-Nieto, A., Palacios-Martín, T., ... & Pérez-Castrillón, J. L. (2012). Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria. *International journal of clinical practice*, 66(9), 891-896.
- 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.

- Campos, Á. S. Á., Akineden, Ö., Fernández-Silva, J. A., & Ramírez-Vásquez, N. F. (2024). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and risk factors associated with high total bacterial count in bulk tank milk from dairy farms in Colombia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-11.
- Carneiro, F. A., dos Reis Cortines, J., Essus, V. A., & da Silva, I. B. N. (2022). Vaccine engineering & structural vaccinology. *In System Vaccinology* (pp. 55-86). Academic Press.
- Candela, M., Biagi, E., Centanni, M., Turrone, S., Vici, M., Musiani, F., ... & Brigidi, P. (2009). *Bifidobacterial* enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology*, 155(10), 3294-3303.
- Carabarin-Lima, A., León-Izurieta, L., Rocha-Gracia, R. D. C., Castañeda-Lucio, M., Torres, C., Gutiérrez-Cazarez, Z., González-Posos, S., Martínez de la Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., & Lozano-Zarain, P. (2016). First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of medical microbiology*, 65(8), 729–737.
- Catalán-Nájera, J. C., Garza-Ramos, U., & Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella spp.* phenotypes?. *Virulence*, 8(7), 1111-1123.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos. (2014) Healthcare-Associated Infections (HAIs). <https://www.cdc.gov/hai/infectiontypes.html>
- Chbib, C., Shah, S. M., Gala, R. P., & Uddin, M. N. (2021). Potential applications of microparticulate-based bacterial outer membrane vesicles (OMVs) vaccine platform for sexually transmitted diseases (STDs): gonorrhoea, chlamydia, and syphilis. *Vaccines*, 9(11), 1245.
- Chen, Y. H., Liu, S. J., Gao, M. M., Zeng, T., Lin, G. W., Tan, N. N., ... & Long, Y. S. (2017). MDH2 is an RNA binding protein involved in downregulation of sodium

- channel Scn1a expression under seizure condition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1492-1499.
- Chmelnitsky, I., Shklyar, M., Hermesh, O., Navon-Venezia, S., Edgar, R., & Carmeli, Y. (2013). Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(1), 74-83.
- Chung The, H., Karkey, A., Pham Thanh, D., Boinett, C. J., Cain, A. K., Ellington, M., ... & Baker, S. (2015). A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO molecular medicine*, 7(3), 227-239.
- Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., & Goodridge, L. D. (2017). Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the *Enterobacteriaceae* family—a review. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1108.
- Cooper, J. M., & Rowley, D. (1982). RESISTANCE TO *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND THE IMPORTANCE OF TWO BACTERIAL ANTIGENS. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 60(6), 629-641.
- 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.
- Crowe, J. D., Sievwright, I. K., Auld, G. C., Moore, N. R., Gow, N. A., & Booth, N. A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular microbiology*, 47(6), 1637-1651.
- De Kruif, P. (1926) *Microbe Hunters*. Haverst
- De Oliveira, D. M., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N., Schembri, M. A., Beatson, S. A., ... & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), e00181-19.

- Decker, B. L., & Wickner, W. T. (2006). Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14523-14528.
- 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.
- Domain, F., Bina, X. R., & Levy, S. B. (2011). Transketolase A, an enzyme in central metabolism, derepresses the marRAB multiple antibiotic resistance operon of *Escherichia coli* by interaction with MarR. *Molecular Microbiology*, 80(3).
- Doorduyn, D. J., Rooijackers, S. H., van Schaik, W., & Bardoel, B. W. (2016). Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, 221(10), 1102-1109.
- du Teil Espina, M., Rubio, A. H., Fu, Y., López-Álvarez, M., Gabarrini, G., & van Dijk, J. M. (2022). Outer membrane vesicles of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis* promote aggregation and phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Oral Health*, 3.
- Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 19(1), 1-9.
- Falcone, M., Tiseo, G., Galfo, V., Giordano, C., Leonildi, A., Marciano, E., ... & Menichetti, F. (2022). Bloodstream infections in patients with rectal colonization by *Klebsiella pneumoniae* producing different type of carbapenemases: a prospective, cohort study (CHIMERA study). *Clinical Microbiology and Infection*, 28(2), 298-e1.
- Fan, F., Chen, G., Deng, S., & Wei, L. (2024). Proteomic analysis of meropenem-induced outer membrane vesicles released by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 12(2), e02917-23.
- Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*,

- Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31(6), 402-409.
- Friedländer, C. (1882). Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, 87(2), 319-324.
- Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ishida, W., Fukata, K., Taniguchi, T., Liu, F. T., & Ueno, H. (2006). Genetic background determines susceptibility to experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis: comparison of Balb/c and C57BL/6 mice. *Experimental eye research*, 82(2), 210-218.
- Fulde, M., Bernardo-García, N., Rohde, M., Nachtigall, N., Frank, R., Preissner, K. T., ... & Bergmann, S. (2014). *Pneumococcal phosphoglycerate* kinase interacts with plasminogen and its tissue activator. *Thrombosis and haemostasis*, 112(03), 401-416.
- Furuyama, N., & Sircili, M. P. (2021). Outer membrane vesicles (OMVs) produced by gram-negative bacteria: structure, functions, biogenesis, and vaccine application. *BioMed Research International*, 2021(1), 1490732.
- Gadahi, J. A., Wang, S., Bo, G., Ehsan, M., Yan, R., Song, X., ... & Li, X. (2016). Proteomic analysis of the excretory and secretory proteins of *Haemonchus contortus* (HcESP) binding to goat PBMCs in vivo revealed stage-specific binding profiles. *PloS one*, 11(7), e0159796.
- Gibhardt, J., Heidemann, J. L., Bremenkamp, R., Rosenberg, J., Seifert, R., Kaefer, V., ... & Commichau, F. M. (2020). An extracytoplasmic protein and a moonlighting enzyme modulate synthesis of c-di-AMP in *Listeria monocytogenes*. *Environmental microbiology*, 22(7), 2771-2791.
- Gilmore, W. J., Johnston, E. L., Bitto, N. J., Zavan, L., O'Brien-Simpson, N., Hill, A. F., & Kaparakis-Liaskos, M. (2022). *Bacteroides fragilis* outer membrane vesicles preferentially activate innate immune receptors compared to their parent bacteria. *Frontiers in Immunology*, 13.

- Girón, J. A., Torres, A. G., Freer, E., & Kaper, J. B. (2002). The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular microbiology*, 44(2), 361-379.
- Goding, J. W. (1996). *Monoclonal antibodies: principles and practice*. Elsevier.
- Gomez-Simmonds, A., & Uhlemann, A. C. (2017). Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl_1), S18-S27.
- Gonzalez-Ferrer, S., Peñaloza, H. F., Budnick, J. A., Bain, W. G., Nordstrom, H. R., Lee, J. S., & Van Tyne, D. (2021). Finding order in the chaos: Outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 89(4), e00693-20.
- González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Ruiz, L., Turróni, F., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P., ... & Margolles, A. (2012). Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Applied and environmental microbiology*, 78(11), 3992-3998.
- Gorrie, C. L., Mirčeta, M., Wick, R. R., Judd, L. M., Lam, M., Gomi, R., ... & Holt, K. E. (2022). Genomic dissection of *Klebsiella pneumoniae* infections in hospital patients reveals insights into an opportunistic pathogen. *Nature Communications*, 13(1), 1-17.
- Greenfield, E. A. (2022). Immunizing animals. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2022(7), pdb-top100180.
- Gu, D., Dong, N., Zheng, Z., Lin, D., Huang, M., Wang, L., ... & Chen, S. (2018). A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, 18(1), 37-46.
- Guerrero, P. P., Sánchez, F. G., Saborido, D. G., & Lozano, I. G. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(55), 3276-3282.

- Hadadi-Fishani, M., Najar-Peerayeh, S., Siadat, S. D., Sekhavati, M., & Mobarez, A. M. (2021). Isolation and immunogenicity of extracted outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* under antibiotics treatment conditions. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(6), 824.
- Haupt, H. (1957). *Enterobacteriaceae* Rahn 1937, an illegitimate name. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 7(3), 127-128.
- Hsu, C. R., Chang, I. W., Hsieh, P. F., Lin, T. L., Liu, P. Y., Huang, C. H., ... & Wang, J. T. (2019). A novel role for the *Klebsiella pneumoniae* Sap (sensitivity to antimicrobial peptides) transporter in intestinal cell interactions, innate immune responses, liver abscess, and virulence. *The Journal of infectious diseases*, 219(8), 1294-1306.
- Hsu, C. R., Pan, Y. J., Liu, J. Y., Chen, C. T., Lin, T. L., & Wang, J. T. (2015). *Klebsiella pneumoniae* translocates across the intestinal epithelium via Rho GTPase-and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent cell invasion. *Infection and immunity*, 83(2), 769-779.
- Howlader, D. R., Koley, H., Sinha, R., Maiti, S., 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.
- Hu, G., Chen, X., Chu, W., Ma, Z., Miao, Y., Luo, X., & Fu, Y. (2022). Immunogenic characteristics of the outer membrane phosphoprotein as a vaccine candidate against *Klebsiella pneumoniae*. *Veterinary Research*, 53(1), 5.
- Hu, Y., Anes, J., Devineau, S., & Fanning, S. (2021). *Klebsiella pneumoniae*: prevalence, reservoirs, antimicrobial resistance, pathogenicity, and infection: a hitherto unrecognized zoonotic bacterium. *Foodborne pathogens and disease*, 18(2), 63-84.
- Hua, Y., Wang, J., Huang, M., Huang, Y., Zhang, R., Bu, F., ... & Wang, Q. (2022). Outer membrane vesicles-transmitted virulence genes mediate the emergence of new antimicrobial-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*, 11(1), 1281-1292.

- Huang, Y., Nan, L., Xiao, C., Dong, J., Li, K., Cheng, J., ... & Liu, Y. (2022). Outer Membrane vesicles coating nano-glycyrrhizic acid confers protection against *Borderella bronchiseptica* through Th1/Th2/Th17 responses. *International Journal of Nanomedicine*, 647-663.
- Hullo, M. F., Auger, S., Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A., & Martin-Verstraete, I. (2007). Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *Journal of bacteriology*, 189(1), 187-197.
- "Infectious Diseases Society of America. (2024). Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections. <https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/practice-guidelines/amr-guidance/4.0/amr-guidance-4.02.pdf>"
- Jagadeesan, B., Koo, O. K., Kim, K. P., Burkholder, K. M., Mishra, K. K., Aroonual, A., & Bhunia, A. K. (2010). LAP, an alcohol acetaldehyde dehydrogenase enzyme in *Listeria*, promotes bacterial adhesion to enterocyte-like Caco-2 cells only in pathogenic species. *Microbiology*, 156(9), 2782-2795.
- 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.
- Jan, A. T. (2017). Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Frontiers in microbiology*, 8, 1053.
- Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., ... & Lee, S. Y. (2004). Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, 117(5), 625-635.
- Jasim, R., Han, M. L., Zhu, Y., Hu, X., Hussein, M. H., Lin, Y. W., ... & Velkov, T. (2018). Lipidomic analysis of the outer membrane vesicles from paired polymyxin-susceptible and-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2356.

- Jiang, M., Wang, Z., Xia, F., Wen, Z., Chen, R., Zhu, D., ... & Dai, J. (2022). Reductions in bacterial viability stimulate the production of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) cytoplasm-carrying extracellular vesicles (EVs). *PLoS pathogens*, 18(10), e1010908.
- Jin, H., Song, Y. P., Boel, G., Kochar, J., & Pancholi, V. (2005). Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *Journal of Molecular Biology*, 350(1), 27-41.
- Jones, D. (1988). Composition and properties of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 1S-19S.
- Joseph, L., Merciecca, T., Forestier, C., Balestrino, D., & Miquel, S. (2021). From *Klebsiella pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models. *Microorganisms*, 9(6), 1282.
- Katakura, Y., Sano, R., Hashimoto, T., Ninomiya, K., & Shioya, S. (2010). Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 319-326.
- Kawser, Z., & Shamsuzzaman, S. M. (2021). Intradermal immunization with heat-killed *Klebsiella pneumoniae* leading to the production of protective immunoglobulin G in BALB/c mice. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 11(3), 160-165.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 634-644.
- Kesimer, M., Kiliç, N., Mehrotra, R., Thornton, D. J., & Sheehan, J. K. (2009). Identification of salivary mucin MUC7 binding proteins from *Streptococcus gordonii*. *BMC microbiology*, 9, 1-10.
- Keystone, J. S., Kozarsky, P. E., Connor, B. A., Nothdurft, H. D., Mendelson, M., & Leder, K. (2018). Travel Medicine E-Book. *Elsevier Health Sciences*.

- Kinnby, B., Booth, N. A., & Svensäter, G. (2008). Plasminogen binding by oral streptococci from dental plaque and inflammatory lesions. *Microbiology*, 154(3), 924-931.
- Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., ... & Saito, T. (2008). Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *Journal of applied microbiology*, 104(6), 1667-1674.
- König, E., Gagliardi, A., Riedmiller, I., Andretta, C., Tomasi, M., Irene, C., ... & Grandi, G. (2021). Multi-antigen outer membrane vesicle engineering to develop polyvalent vaccines: the *Staphylococcus aureus* case. *Frontiers in Immunology*, 12, 752168.
- Kozik, A., Karkowska-Kuleta, J., Zajac, D., Bochenska, O., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., & Rapala-Kozik, M. (2015). Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. *BMC microbiology*, 15, 1-15.
- Kulkarni, H. M., & Jagannadham, M. V. (2014). Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 160(10), 2109-2121.
- La Guidara, C., Adamo, R., Sala, C., & Micoli, F. (2024). Vaccines and monoclonal antibodies as alternative strategies to antibiotics to fight antimicrobial resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5487.
- Labroussaa, F., Arricau-Bouvery, N., Dubrana, M. P., & Saillard, C. (2010). Entry of *Spiroplasma citri* into *Circulifer haematoceps* cells involves interaction between spiroplasma phosphoglycerate kinase and leafhopper actin. *Applied and environmental microbiology*, 76(6), 1879-1886.
- Lam, M., Wick, R. R., Watts, S. C., Cerdeira, L. T., Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2021). A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature communications*, 12(1), 1-16.

- Lathrop, J. T., Wei, B. Y., Touchie, G. A., & Kadner, R. J. (1995). Sequences of the *Escherichia coli* BtuB protein essential for its insertion and function in the outer membrane. *Journal of bacteriology*, 177(23), 6810-6819.
- Lay, A. J., Jiang, X. M., Kisker, O., Flynn, E., Underwood, A., Condrón, R., & Hogg, P. J. (2000). Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature*, 408(6814), 869-873.
- Lei, E. K., Azmat, A., Henry, K. A., & Hussack, G. (2024). Outer membrane vesicles as a platform for the discovery of antibodies to bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 232.
- Lee, J. C., Lee, E. J., Lee, J. H., Jun, S. H., Choi, C. W., Kim, S. I., ... & Hyun, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS microbiology letters*, 331(1), 17-24.
- Lee, W. H., Choi, H. I., Hong, S. W., Kim, K. S., Gho, Y. S., & Jeon, S. G. (2015). Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Experimental & molecular medicine*, 47(9), e183-e183.
- Lery, L. M., Frangeul, L., Tomas, A., Passet, V., Almeida, A. S., Bialek-Davenet, S., ... & Tournebise, R. (2014). Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC biology*, 12, 1-15.
- Li, P., Luo, W., Xiang, T. X., Jiang, Y., Liu, P., Wei, D. D., ... & Zhang, W. (2022). Horizontal gene transfer via OMVs co-carrying virulence and antimicrobial-resistant genes is a novel way for the dissemination of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 945972.
- Lin, Y. C., Lu, M. C., Tang, H. L., Liu, H. C., Chen, C. H., Liu, K. S., ... & Lai, Y. C. (2011). Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain. *BMC microbiology*, 11(1), 1-8.

- Liu, Q., Shang, Y., Shen, L., Yu, X., Cao, Y., Zeng, L., ... & Huang, X. (2024). Outer membrane vesicles from genetically engineered *Salmonella* enterica serovar Typhimurium presenting *Helicobacter pylori* antigens UreB and CagA induce protection against *Helicobacter pylori* infection in mice. *Virulence*, 15(1), 2367783.
- Lopardo, H. A., Predari, S. C., & Vay, C. (2016). Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología. Volumen I. *Bacterias de importancia clínica*. 429p.
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 4.
- Martora, F., Pinto, F., Folliero, V., Cammarota, M., Dell'Annunziata, F., Squillaci, G., ... & Franci, G. (2019). Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles. *Microbial pathogenesis*, 136, 103719.
- McMillan, H. M., & Kuehn, M. J. (2023). Proteomic profiling reveals distinct bacterial extracellular vesicle subpopulations with possibly unique functionality. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(1), e01686-22.
- Menikpurage, I. P., Barraza, D., Meléndez, A. B., Strebe, S., & Mera, P. E. (2019). The B12 receptor BtuB alters the membrane integrity of *Caulobacter crescentus*. *Microbiology*, 165(3), 311-323.
- Motley, M. P., Diago-Navarro, E., Banerjee, K., Inzerillo, S., & Fries, B. C. (2020). The role of IgG subclass in antibody-mediated protection against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Mbio*, 11(5), 10-1128.
- Nishiyama, K., Takaki, T., Sugiyama, M., Fukuda, I., Aiso, M., Mukai, T., ... & Okada, N. (2020). Extracellular vesicles produced by *Bifidobacterium longum* export mucin-binding proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(19), e01464-20.

- Noroozi, N., Gargari, S. L. M., Nazarian, S., Sarvary, S., & Adriani, R. R. (2018). Immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* outer membrane vesicles encapsulated in chitosan nanoparticles. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(3), 284.
- Opoku-Temeng, C., Malachowa, N., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2022). Innate host defense against *Klebsiella pneumoniae* and the outlook for development of immunotherapies. *Journal of Innate Immunity*, 14(3), 167-181.
- Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2021). Differential Packaging Into Outer Membrane Vesicles Upon Oxidative Stress Reveals a General Mechanism for Cargo Selectivity. *Frontiers in microbiology*, 12, 561863.
- Organización Mundial de la Salud. (2018) Carga mundial de Infecciones Asociadas a la Atención Sanitaria. http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/
- Pachay Solórzano, J. W. (2018). Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca”, Portoviejo. *Revista Universidad y Sociedad*, 10(5), 219-223.
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629-661.
- Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J. A., & Albertí, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 177-183.
- Pareek, V., Devineau, S., Sivasankaran, S. K., Bhargava, A., Panwar, J., Srikumar, S., & Fanning, S. (2021). Silver nanoparticles induce a triclosan-like antibacterial action mechanism in multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 12, 638640.

- Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N., & Pitout, J. D. (2020). Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(10), e01148-20.
- Piperaki, E. T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouveleki, L. S., & Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *The Pediatric infectious disease journal*, 36(10), 1002-1005.
- Pitout, J. D. (2008). Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert review of anti-infective therapy*, 6(5), 657-669.
- Płaczkiwicz, J., Gieczewska, K., Musiałowski, M., Adamczyk-Popławska, M., Bącal, P., & Kwiatek, A. (2023). Availability of iron ions impacts physicochemical properties and proteome of outer membrane vesicles released by *Neisseria gonorrhoeae*. *Scientific reports*, 13(1), 18733.
- Qing, G., Gong, N., Chen, X., Chen, J., Zhang, H., Wang, Y., ... & Liang, X. J. (2019). Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophysics Reports*, 5(4), 184-198.
- Rao, K., Patel, A., Sun, Y., Vornhagen, J., Motyka, J., Collingwood, A., ... & Bachman, M. A. (2021). Risk Factors for *Klebsiella* Infections among Hospitalized Patients with Preexisting Colonization. *Mosphere*, 6(3), e00132-21.
- Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00001-19.
- Salosensaari, A., Laitinen, V., Havulinna, A. S., Meric, G., Cheng, S., Perola, M., ... & Niiranen, T. (2021). Taxonomic signatures of cause-specific mortality risk in human gut microbiome. *Nature communications*, 12(1), 1-8.
- Secretaría de Salud (2019) Manual para la implementación de los Paquetes de Acciones para prevenir y Vigilar las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAAS). http://www.calidad.salud.gob.mx/site/editorial/docs/manual_IAAS.pdf

- Secretaría de Salud. (2023). Informe de labores 2022-2023. Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/853455/SALUD_5toInformeLabores.pdf
- Secretaría de Salud. (2024). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud (IAAS) - RHOVE. Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/920660/Manual_de_procedimientos_estandarizados_para_la_vigilancia_epidemiologica_de_las_IAAS_-_RHOVE_junio_2024.pdf
- Selden, R., Lee, S., Wang, W. L. L., BENNETT, J. V., & EICKHOFF, T. C. (1971). Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. *Annals of Internal Medicine*, 74(5), 657-664.
- Sharma, A., Rishi, P., & Singh, R. (2023). In vitro and in vivo evaluation of DNase I in reinstating antibiotic efficacy against *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Pathogens and Disease*, 81, ftad001.
- Sharma, D., Garg, A., Kumar, M., Rashid, F., & Khan, A. U. (2019). Down-regulation of flagellar, fimbriae, and pili proteins in Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (NDM-4) clinical isolates: a novel linkage to drug resistance. *Frontiers in microbiology*, 10, 2865.
- Shasmal, M., Dey, S., Shaikh, T. R., Bhakta, S., & Sengupta, J. (2016). *E. coli* metabolic protein aldehyde-alcohol dehydrogenase-E binds to the ribosome: a unique moonlighting action revealed. *Scientific reports*, 6(1), 19936.
- Shen, Z., Qin, J., Xiang, G., Chen, T., Nurxat, N., Gao, Q., ... & Li, M. (2024). Outer membrane vesicles mediating horizontal transfer of the epidemic bla OXA-232 carbapenemase gene among *Enterobacterales*. *Emerging Microbes & Infections*, 13(1), 2290840
- Shen, Z., Qin, J., Xiang, G., Chen, T., Nurxat, N., Gao, Q., ... & Li, M. (2024). Outer membrane vesicles mediating horizontal transfer of the epidemic bla OXA-232 carbapenemase gene among *Enterobacterales*. *Emerging Microbes & Infections*, 13(1), 2290840.

- Shetty, S., Muniyappa, H., Halady, P. K., & Idell, S. (2004). Regulation of urokinase receptor expression by phosphoglycerate kinase. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(1), 100-106.
- Shon, A. S., Bajwa, R. P., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107-118.
- Soto, E., Marchi, S., Beierschmitt, A., Kearney, M., Francis, S., VanNess, K., ... & Palmour, R. (2016). Interaction of non-human primate complement and antibodies with hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*. *Veterinary Research*, 47(1), 1-13.
- Strakova, N., Korena, K., & Karpiskova, R. (2021). *Klebsiella pneumoniae* producing bacterial toxin colibactin as a risk of colorectal cancer development-A systematic review. *Toxicon*, 197, 126-135.
- Struve, C., Roe, C. C., Stegger, M., Stahlhut, S. G., Hansen, D. S., Engelthaler, D. M., ... & Krogfelt, K. A. (2015). Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *MBio*, 6(4), e00630-15.
- Sun, J., Huang, Y., Li, X., Xu, X., Cui, X., Hao, F., ... & Liu, Y. (2024). Characterization and immunological effect of outer membrane vesicles from *Pasteurella multocida* on macrophages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 238.
- Tang, B., Yang, A., Liu, P., Wang, Z., Jian, Z., Chen, X., ... & Liu, W. (2023). Outer membrane vesicles transmitting bla NDM-1 mediate the emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(5), e01444-22.
- Tilahun, M., Gedefie, A., & Ashagire, M. (2021). Emerging carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infection, its epidemiology and novel treatment options: a review. *Infection and Drug Resistance*, 14, 4363.

- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., & Harshey, R. M. (2000). Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*: critical role for lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology*, 182(22), 6308-6321.
- Toyofuku, M., Schild, S., Kaparakis-Liaskos, M., & Eberl, L. (2023). Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 21(7), 415-430.
- Trott, O & Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 455-461
- Trunova, G. V., Makarova, O. V., Diatropov, M. E., Bogdanova, I. M., Mikchailova, L. P., & Abdulaeva, S. O. (2011). Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57BL/6 mice. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 151, 99-102.
- Tsai, S. S., Huang, J. C., Chen, S. T., Sun, J. H., Wang, C. C., Lin, S. F., ... & Huang, Y. Y. (2010). Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in community-acquired and nosocomial infections in diabetic patients. *Chang Gung Med J*, 33(5), 532-9.
- Uddin, M. J., Ma, C. J., Kim, J. C., & Ahn, J. (2019). Proteomics-based discrimination of differentially expressed proteins in antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant *Salmonella Typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *Archives of microbiology*, 201, 1259-1275.
- van Duin, D., & Paterson, D. L. (2020). Multidrug-resistant bacteria in the community: an update. *Infectious Disease Clinics*, 34(4), 709-722.
- Vázquez, M. E., Mesías, A. C., Acuña, L., Spangler, J., Zabala, B., Parodi, C., ... & Brandán, C. P. (2023). Exploring the performance of *Escherichia coli* outer membrane vesicles as a tool for vaccine development against Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 118, e220263.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.

- Viviani, V., Fantoni, A., Tomei, S., Marchi, S., Luzzi, E., Bodini, M., ... & Bartolini, E. (2023). OpcA and PorB are novel bactericidal antigens of the 4CMenB vaccine in mice and humans. *npj Vaccines*, 8(1), 54.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*, 17(17), 6278.
- Wang, S., Luo, J., Wang, H., Chen, T., Sun, J., Xi, Q., & Zhang, Y. (2024). Extracellular Vesicles: A Crucial Player in the Intestinal Microenvironment and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3478.
- World Health Organization-WHO. (2024). Bacterial Priority Pathogens List. Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>
- Wu, G., Ji, H., Guo, X., Li, Y., Ren, T., Dong, H., ... & He, B. (2020). Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 24, 102148.
- Wu, M. C., Chen, Y. C., Lin, T. L., Hsieh, P. F., & Wang, J. T. (2012). Cellobiose-specific phosphotransferase system of *Klebsiella pneumoniae* and its importance in biofilm formation and virulence. *Infection and immunity*, 80(7), 2464-2472.
- Wu, M. C., Lin, T. L., Hsieh, P. F., Yang, H. C., & Wang, J. T. (2011). Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PloS one*, 6(8), e23500.
- Xiao, M., Li, G., & Yang, H. (2023). Microbe-host interactions: structure and functions of Gram-negative bacterial membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1225513.

- Xiong, H., Keith, J. W., Samilo, D. W., Carter, R. A., Leiner, I. M., & Pamer, E. G. (2016). Innate lymphocyte/Ly6Chi monocyte crosstalk promotes *Klebsiella pneumoniae* clearance. *Cell*, 165(3), 679-689.
- Xiu, L., Wu, Y., Lin, G., Zhang, Y., & Huang, L. (2024). Bacterial membrane vesicles: orchestrators of interkingdom interactions in microbial communities for environmental adaptation and pathogenic dynamics. *Frontiers in Immunology*, 15, 1371317.
- Yang, S. K., Yusoff, K., Ajat, M., Thomas, W., Abushelaibi, A., Akseer, R., ... & Lai, K. S. (2019). Disruption of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* membrane via induction of oxidative stress by cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl) essential oil. *PloS one*, 14(4), e0214326.
- Yao, L., Wei, B., Wang, Y., Xu, B., Yang, M., Chen, X., & Chen, F. (2023). A critical role of outer membrane vesicles in antibiotic resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22(1), 95.
- Ye, C., Li, W., Yang, Y., Liu, Q., Li, S., Zheng, P., ... & Ma, Y. (2021). Inappropriate use of antibiotics exacerbates inflammation through OMV-induced pyroptosis in MDR *Klebsiella pneumoniae* infection. *Cell Reports*, 36(12).
- Zammit, S. C., Azzopardi, N., & Sant, J. (2014). Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *European journal of internal medicine*, 25(6), 571-576.
- Zegadło, K., Gieroń, M., Żarnowiec, P., Durlík-Popińska, K., Kręcis, B., Kaca, W., & Czerwonka, G. (2023). Bacterial motility and its role in skin and wound infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1707.
- Zhang, S., Yang, G., Ye, Q., Wu, Q., Zhang, J., & Huang, Y. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolated from retail foods in China. *Frontiers in microbiology*, 9, 289.

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.

16 Anexos

16.1 Información sobre *Citrobacter freundii* (Control de multidrogorresistencia).

Aislada a partir de una muestra de agua termal del balneario “San Lorenzo” ubicado Tehuacán, Puebla; identificada mediante microbiología clásica y MALDI-TOF/MS (Equipo Bruker Daltonics, Microflex LT) con el siguiente perfil de resistencia (Leyva, tesis licenciatura, comunicación directa): Resistente: NF, CL, STX, CFX, CF, CB; Resistencia intermedia: CPF; Sensible: AK, GE, NET, NOF

16.2 Protocolo de precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio.

Una vez obtenida la sangre heparinizada se debe centrifugar por 30 min a 10,000 g. Agregar una parte de Tris-HCl 1 M pH 8.0 a diez partes de la muestra. Agregar gota a gota la solución saturada de sulfato de amonio hasta lograr una concentración final del 50%. Incubar a 4° C durante 6 horas con agitación continua y centrifugar durante 30 min a 10,000 g. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla con sulfato de amonio al 50% 2 veces. Disolver la pastilla en un volumen de PBS (5-10% del volumen final). Colocar la solución para su diálisis con agitación a 4°C durante toda la noche.

16.3 Información sobre el control positivo utilizado para los ensayos de movilidad.

La cepa donada por el Dr. Alfredo Torres, una cepa de *Escherichia coli* 2348/69 (E2348/69) (O127:H6), Enteropatógena nativa (EPEC-WT) con movilidad expresada en los medios: LB, MEM y PC-DMEM.

16.4 Información sobre el control negativo utilizado para los ensayos de movilidad.

Nuevamente, el Dr. Torres donó una cepa mutada de *Escherichia coli* derivada de E2348/69, con una mutación en *fliC* (gen de la flagelina) – *fliC::cat* denominada (EAGT01) con movilidad nula (Girón *et al.*, 2000).

16.5 Nombre de las 72 proteínas propias de las OMVs de KpATCC700603.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|---|---------------|-----------|
| 1 | A0A0H3GPR6 | 5-hidroxiisourato hidrolasa (HIU hidrolasa) (HIUHase) (EC 3.5.2.17) | 108 | 11442 |
| 2 | A0A0H3GWM4 | Proteína de subunidad ribosomal pequeña uS10 | 103 | 11767 |
| 3 | A0A0H3GWB1 | Proteína de modulación Sigma-54 | 111 | 12549 |
| 4 | A0A0H3GUB3 | Fosfatasa | 117 | 12577 |
| 5 | A0A0H3GVC3 | Proteína no caracterizada | 119 | 13050 |
| 6 | A0A0H3H464 | Factor regulador PanD | 127 | 14561 |
| 7 | A0A0H3GYM2 | Ribonucleasa VapC (RNasa VapC) (EC 3.1.-.-) (Toxina VapC) | 138 | 15139 |
| 8 | A0A0H3GLC0 | Proteína que contiene el dominio UspA | 142 | 15952 |
| 9 | A0A0H3H3Q3 | Proteína transportadora de carboxilo de biotina de la acetil-CoA carboxilasa | 155 | 16467 |
| 10 | A0A0H3GPW6 | Acil-CoA tioesterasa de cadena media/larga YigI (EC 3.1.2.20) | 154 | 16941 |
| 11 | A0A0H3GUS5 | Fosfopanteteína adenililtransferasa (EC 2.7.7.3) (Desfosfo-CoA pirofosforilasa) (Panteteína-fosfato adenililtransferasa) (PPAT) | 159 | 17663 |
| 12 | A0A0H3GVG2 | dihidroorotasa (EC 3.5.2.3) | 161 | 17828 |
| 13 | A0A0H3GZ96 | Proteína de subunidad ribosómica grande uL6 | 177 | 18844 |
| 14 | A0A0H3H084 | Ferritina (EC 1.16.3.2) | 165 | 19208 |
| 15 | A0A0H3GLE9 | dihidroorotasa (EC 3.5.2.3) | 176 | 19753 |
| 16 | A0A0H3GPY8 | Flavodoxina | 176 | 19765 |
| 17 | A0A0H3GLR2 | Supuesta NAD(P)H nitroreductasa (EC 1.-.-.-) | 183 | 20217 |
| 18 | A0A0H3GWA7 | NADH-quinona oxidorreductasa subunidad I (EC 7.1.1.-) (NADH deshidrogenasa I subunidad I) (NDH-1 subunidad I) | 180 | 20433 |
| 19 | A0A0H3GPZ5 | Proteína de terminación/antiterminación de la transcripción NusG | 181 | 20546 |
| 20 | A0A0H3GYC9 | Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (EC 5.2.1.8) | 195 | 20744 |
| 21 | A0A0H3GQE0 | N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa | 188 | 21470 |
| 22 | A0A0H3GXU0 | Proteína que contiene el dominio C-terminal de la ribosa-5-fosfato isomerasa | 212 | 23212 |
| 23 | A0A0H3GTH5 | Proteína similar a YfdX | 223 | 23615 |
| 24 | A0A0H3GVR7 | Glutación S-transferasa | 209 | 23743 |
| 25 | A0A0H3GL02 | Dihidropteridina reductasa/insensible al oxígeno NAD(P)H nitroreductasa | 217 | 23985 |
| 26 | A0A0H3GNE4 | Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.23) (OMP descarboxilasa) (OMPDCasa) (OMPdecase) | 228 | 24664 |
| 27 | A0A0H3GST7 | Chaperona periplásmica | 234 | 25487 |
| 28 | A0A0H3GLY0 | Fosfatasa ácida de clase B (EC 3.1.3.2) | 237 | 26103 |
| 29 | A0A0H3GGB5 | Proteína reguladora de la transcripción CpxR (Regulador de respuesta CpxR) | 232 | 26272 |
| 30 | A0A0H3GI32 | Hidrolasa | 238 | 26492 |
| 31 | A0A0H3GS16 | Aldehído deshidrogenasa B (Lactaldehído deshidrogenasa) | 240 | 26502 |
| 32 | A0A0H3GQA9 | Subunidad de hierro-azufre de la succinato deshidrogenasa (EC 1.3.5.1) | 238 | 26724 |
| 33 | A0A0H3H078 | Flavodoxina/ferredoxina--NADP reductasa (EC 1.18.1.2) (EC 1.19.1.1) (Ferredoxina (flavodoxina):NADP(+) oxidorreductasa) (Ferredoxina--NADP reductasa) (Flavodoxina--NADP reductasa) | 248 | 27873 |
| 34 | A0A0H3GMS4 | Subunidad C-terminal de la isomerasa/descarboxilasa bifuncional de degradación de 4-hidroxifenilacetato | 254 | 28636 |
| 35 | A0A0H3GN28 | 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato reductasa (HTPA reductasa) (EC 1.17.1.8) | 273 | 28648 |
| 36 | A0A0H3GN15 | 2,5-diceto-D-gluconato reductasa B | 267 | 29298 |

Continuación del anexo 16.5.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|--|---------------|-----------|
| 37 | A0A0H3GWL9 | Proteína de subunidad ribosomal grande uL2 | 273 | 29834 |
| 38 | A0A0H3GJS1 | Transportador de aminoácidos ABC, proteína de unión a aminoácidos periplásmicos | 283 | 31021 |
| 39 | A0A0H3GWW5 | 7-ciano-7-desazaguanina reductasa dependiente de NADPH (EC 1.7.1.13) (7-ciano-7-carbaguanina reductasa) (nitrilo oxidorreductasa dependiente de NADPH) (PreQ(0) reductasa) | 281 | 31867 |
| 40 | A0A0H3GR66 | Proteína transportadora de malonil CoA-acilo transacilasa (EC 2.3.1.39) | 309 | 32311 |
| 41 | A0A0H3GNW5 | Ácido delta-aminolevulínico deshidratasa (EC 4.2.1.24) | 324 | 35456 |
| 42 | A0A0H3GLT4 | Succinilglutamato desuccinilasa (EC 3.5.1.96) | 321 | 36513 |
| 43 | A0A0H3GUI1 | Represor transcripcional de tipo HTH PurR (represor del regulón Pur) (represor de la síntesis de nucleótidos de purina) | 341 | 38061 |
| 44 | A0A0H3GUD5 | Componente de unión periplásmico del transportador de aminoácidos de cadena ramificada de alta afinidad | 367 | 38876 |
| 45 | A0A0H3GW25 | Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa | 358 | 39219 |
| 46 | A0A0H3GZM8 | Proteína de unión al sustrato periplásmico del transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada de alta afinidad | 369 | 39441 |
| 47 | A0A0H3GV71 | Proteína bifuncional de biosíntesis de histidina HisB [Incluye: Histidinol-fosfatasa (EC 3.1.3.15); Fosfato de imidazol-glicerol deshidratasa (IGPD) (EC 4.2.1.19)] | 355 | 40180 |
| 48 | A0A0H3GP38 | Aminotransferasa de acetilornitina/succinildiaminopimelato (ACOAT) (DapATasa) (Succinildiaminopimelato transferasa) (EC 2.6.1.11) (EC 2.6.1.17) | 401 | 42400 |
| 49 | A0A0H3GVM4 | Enzima | 373 | 42648 |
| 50 | A0A0H3H4H3 | 2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligasa (AKB ligasa) (EC 2.3.1.29) (Glicina acetiltransferasa) | 397 | 43156 |
| 51 | A0A0H3GWQ1 | Cisteína desulfurasa lscS (EC 2.8.1.7) | 404 | 45056 |
| 52 | A0A0H3GV01 | 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19) (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) (EPSP sintasa) (EPSPS) | 427 | 46099 |
| 53 | A0A0H3GTF8 | Inorgánico trifosfatasa | 432 | 48297 |
| 54 | A0A0H3GVB1 | Proteína bifuncional GImU [Incluye: UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa (EC 2.7.7.23) (N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa); Glucosamina-1-fosfato N-acetiltransferasa (EC 2.3.1.157)] | 456 | 49058 |
| 55 | A0A0H3GSQ9 | N-succinilarginina dihidrolasa (EC 3.5.3.23) | 446 | 49436 |
| 56 | A0A0H3GXZ5 | Diaminobutirato--2-oxoglutarato aminotransferasa | 461 | 49911 |
| 57 | A0A0H3GSS3 | Fosfo-beta-glucosidasa | 464 | 51894 |
| 58 | A0A0H3H2L3 | Lisina--ARNt ligasa (EC 6.1.1.6) (Lisil-ARNt sintetasa) (LysRS) | 505 | 57546 |
| 59 | A0A0H3GT88 | Lisina--ARNt ligasa (EC 6.1.1.6) (Lisil-ARNt sintetasa) (LysRS) | 505 | 57651 |
| 60 | A0A0H3GQ24 | Proteína de biosíntesis de purina bifuncional PurH [Incluye: Fosforribosilaminoimidazolcarboxamida formiltransferasa (EC 2.1.2.3) (AICAR transformilasa); IMP ciclohidrolasa (EC 3.5.4.10) (ATIC) (IMP sintasa) (Inosinicasa)] | 538 | 58290 |
| 61 | A0A0H3GR70 | 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa, componente oxigenasa (EC 1.14.14.9) | 520 | 58856 |
| 62 | A0A0H3GWB2 | NADH-quinona oxidorreductasa subunidad C/D (EC 7.1.1.-) (NADH deshidrogenasa I subunidad C/D) (NDH-1 subunidad C/D) | 602 | 69110 |
| 63 | A0A0H3GPK3 | Treonina-ARNt ligasa (EC 6.1.1.3) (Treonil-ARNt sintetasa) (ThrRS) | 642 | 73937 |
| 64 | A0A0H3GLC5 | Proteína de tipo choque frío cspE | 69 | 7449 |
| 65 | A0A0H3GJ60 | Proteasa Lon (EC 3.4.21.53) (Proteasa dependiente de ATP La) | 741 | 82516 |
| 66 | A0A0H3GU43 | Lipoproteína principal de la membrana externa Lpp | 78 | 8386 |
| 67 | A0A0H3GQX4 | Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP | 759 | 84156 |
| 68 | A0A0H3GVI1 | Proteína transportadora de acilo (ACP) | 78 | 8640 |
| 69 | A0A0H3GTH6 | Proteína de la familia DUF2526 | 77 | 8751 |
| 70 | A0A0H3GJE4 | Aconitato Hidratasa B (EC 4.2.1.3) (EC 4.2.1.99) (2-metilisocitrato deshidratasa) | 839 | 90665 |
| 71 | A0A0H3GI27 | Ribonucleasa R (RNasa R) (EC 3.1.13.1) | 810 | 91858 |
| 72 | A0A0H3H0Y6 | Subunidad A de la girasa del ADN (EC 5.6.2.2) | 877 | 96982 |

16.6 Nombre de las 142 proteínas propias de las OMVs de KpBUAP021.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|---|---------------|-----------|
| 1 | A0A0H3H3H3 | Proteína de subunidad ribosomal pequeña uS15 | 89 | 10209 |
| 2 | A0A0H3GL55 | Acilfosfatasa (EC 3.6.1.7) (Acilfosfato fosfohidrolasa) | 93 | 10248 |
| 3 | A0A0H3GXU7 | Proteasa 3 (EC 3.4.24.55) (Pitrilisina) (Proteasa III) (Proteasa pi) | 950 | 106095 |
| 4 | A0A0H3GZC9 | Proteína de la familia OsmC/Ohr | 98 | 10745 |
| 5 | A0A0H3GXX3 | Proteína que contiene el dominio DUF883 | 101 | 11015 |
| 6 | A0A0H3GRY6 | Sistema PTS, componente IIB específico de N,N'-diacetilquitobiosa | 106 | 11441 |
| 7 | A0A0H3GLT9 | Activador transcripcional de unión al ADN OsmE | 112 | 12278 |
| 8 | A0A0H3GY16 | Proteína que contiene el dominio CRM | 110 | 12316 |
| 9 | A0A0H3GTC1 | Proteína no caracterizada | 129 | 13803 |
| 10 | A0A0H3GQS6 | Citocromo b562 soluble | 128 | 13855 |
| 11 | A0A0H3GUA4 | nitrito reductasa (quinona) (EC 1.7.5.1) | 1247 | 140511 |
| 12 | A0A0H3H383 | 7,8-dihidroneopteroína aldolasa (EC 4.1.2.25) | 127 | 14093 |
| 13 | A0A0H3GRS4 | Glioxalasa | 128 | 14550 |
| 14 | A0A0H3GYX1 | Factor A de unión al ribosoma | 133 | 15096 |
| 15 | A0A0H3GUH2 | Lipoproteína de membrana externa | 155 | 15255 |
| 16 | A0A0H3GUZ5 | Proteína de unión al ADN | 135 | 15286 |
| 17 | A0A0H3GPM4 | Inhibidor de la lisozima | 148 | 15822 |
| 18 | A0A0H3GSY1 | Proteína de unión a peptidoglicano LysM | 149 | 15909 |
| 19 | A0A0H3GX66 | Nicotinamida-nucleótido amidohidrolasa PncC | 165 | 17396 |
| 20 | A0A0H3GQL6 | Inhibidor de la ADN girasa | 157 | 17761 |
| 21 | A0A0H3GKN4 | Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa) (EC 5.2.1.8) | 164 | 18125 |
| 22 | A0A0H3GU32 | Bacterioferritina (EC 1.16.3.1) | 158 | 18325 |
| 23 | A0A0H3GQH9 | Proteína B de biosíntesis del cofactor de molibdeno | 170 | 18615 |
| 24 | A0A0H3GVP5 | Proteína no caracterizada | 168 | 18922 |
| 25 | A0A0H3H3U3 | Péptido deformilasa (PDF) (EC 3.5.1.88) (Polipéptido deformilasa) | 169 | 19370 |
| 26 | A0A0H3GLK2 | Pirofosfatasa inorgánica (EC 3.6.1.1) (Pirofosfato fosfohidrolasa) (PPasa) | 176 | 19721 |
| 27 | A0A0H3GZE1 | Proteína reguladora de la transcripción de la familia TetR | 178 | 19762 |
| 28 | A0A0H3H0U1 | Receptor de colicina I | 176 | 19934 |
| 29 | A0A0H3GJG3 | Hipoxantina fosforribosiltransferasa (EC 2.4.2.8) | 178 | 20122 |
| 30 | A0A0H3GMF0 | Proteína de la familia YtfJ | 185 | 20457 |
| 31 | A0A0H3GH69 | Factor de elongación P (EF-P) | 188 | 20603 |
| 32 | A0A0H3GIN7 | Proteína de la familia YaeQ | 181 | 20696 |
| 33 | A0A0H3GT51 | Flavina preniltransferasa UbiX (EC 2.5.1.129) | 189 | 20811 |
| 34 | A0A0H3GIU5 | Proteína periplásmica inducible por hiperosmosis | 206 | 21314 |
| 35 | A0A0H3GMM2 | Proteína UPF0307 KPHS_04740 | 183 | 21332 |
| 36 | A0A0H3GYN8 | Glicerol deshidratasa | 194 | 21341 |
| 37 | A0A0H3GV30 | Proteína que contiene el dominio DUF1349 | 190 | 21529 |
| 38 | A0A0H3GU13 | Regulador transcripcional de la familia TetR | 191 | 21598 |
| 39 | A0A0H3GZY5 | Lipoproteína de membrana externa | 220 | 22384 |
| 40 | A0A0H3GP63 | Glutatión S-transferasa | 201 | 22424 |
| 41 | A0A0H3GKZ2 | Proteína transportadora de lipoproteína de membrana externa | 203 | 22558 |
| 42 | A0A0H3GW17 | Uracilo fosforribosiltransferasa (EC 2.4.2.9) (UMP pirofosforilasa) (UPRTasa) | 208 | 22565 |
| 43 | A0A0H3GYP2 | Subunidad de unión a ADP de la dihidroxiacetona quinasa | 210 | 22745 |
| 44 | A0A0H3GMC6 | Enzima | 215 | 23410 |
| 45 | A0A0H3GVM1 | Proteína reguladora de la transcripción RcsB | 216 | 23720 |
| 46 | A0A0H3GQZ7 | Cisteína hidrolasa | 225 | 24095 |
| 47 | A0A0H3GVR9 | CTP sintasa (hidrolizante de glutamina) (EC 6.3.4.2) | 230 | 25124 |

Continuación del anexo 16.6.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|--|---------------|-----------|
| 48 | A0A0H3GRR1 | Proteína de choque de fagos PspA | 222 | 25444 |
| 49 | A0A0H3GY33 | Lipoproteína | 237 | 25448 |
| 50 | A0A0H3GM56 | Proteína de unión periplásmica del tercer sistema de transporte de arginina | 243 | 26677 |
| 51 | A0A0H3GU89 | Proteína periplásmica del transportador de molibdato | 257 | 26949 |
| 52 | A0A0H3GMZ9 | 3-hidroxiácido deshidrogenasa dependiente de NADP YdfG (EC 1.1.1.298) (EC 1.1.1.381) (L-alo-treonina deshidrogenasa) (Malónica semialdehído reductasa) | 249 | 27229 |
| 53 | A0A0H3GWQ6 | 16S rRNA (guanina(1405)-N(7))-metiltransferasa (EC 2.1.1.179) | 251 | 27408 |
| 54 | A0A0H3H1W1 | Sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa | 259 | 27838 |
| 55 | A0A0H3GUJ4 | Proteína periplásmica de unión al sustrato del transportador ABC de molibdato | 269 | 28014 |
| 56 | A0A0H3GLP6 | Proteína de andamiaje para la holoenzima sintetizadora de mureína | 248 | 28038 |
| 57 | A0A0H3GSD1 | Deshidrogenasa | 267 | 28109 |
| 58 | A0A0H3GZK9 | Dihidropteroato sintasa (DHPS) (EC 2.5.1.15) (Dihidropteroato pirofosforilasa) | 271 | 28470 |
| 59 | A0A0H3GRN0 | Cadena alfa de la triptófano sintasa (EC 4.2.1.20) | 269 | 28544 |
| 60 | A0A0H3GK59 | Componente de unión periplásmico del sistema de transporte de cisteína | 269 | 28721 |
| 61 | A0A0H3GU42 | Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (EC 5.2.1.8) | 276 | 29403 |
| 62 | A0A0H3GJU8 | Carbono-nitrógeno hidrolasa | 261 | 29665 |
| 63 | A0A0H3GPN6 | Proteína del dominio transcetolasa | 276 | 30232 |
| 64 | A0A0H3GMJ5 | 5-desoxi-glucuronato isomerasa | 269 | 30440 |
| 65 | A0A0H3GV49 | Cloroperoxidasa no hemo | 278 | 30679 |
| 66 | A0A0H3GUB6 | 2-deshidro-3-desoxifosfoctonato aldolasa (EC 2.5.1.55) (3-desoxi-D-mano-octulosónico ácido 8-fosfato sintasa) (KDO-8-fosfato sintasa) (KDO 8-P sintasa) (KDOPS) (Fosfo-2-deshidro-3-desoxioctonato aldolasa) | 284 | 30825 |
| 67 | A0A0H3GNU6 | Proteína bifuncional FoD [Incluye: Metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa (EC 1.5.1.5); Metileno-tetrahidrofolato ciclohidrolasa (EC 3.5.4.9)] | 288 | 30974 |
| 68 | A0A0H3GW13 | 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa (HTPA sintasa) (EC 4.3.3.7) | 292 | 31162 |
| 69 | A0A0H3GN17 | Beta-lactamasa (EC 3.5.2.6) | 286 | 31239 |
| 70 | A0A0H3GS49 | Dihydrodipicolinato sintasa | 293 | 31249 |
| 71 | A0A0H3GQX0 | Citidina desaminasa (EC 3.5.4.5) (Citidina aminohidrolasa) (CDA) | 294 | 31477 |
| 72 | A0A0H3H688 | Beta-lactamasa (EC 3.5.2.6) | 286 | 31515 |
| 73 | A0A0H3GTX5 | Oxidoreductasa | 304 | 32418 |
| 74 | A0A0H3GKD9 | Porfobilinógeno desaminasa (PBG) (EC 2.5.1.61) (Hidroximetilbilano sintasa) (HMBS) (Pre-uroporfirinógeno sintasa) | 313 | 33801 |
| 75 | A0A0H3GWW1 | Regulador negativo periplásmico de sigmaE | 308 | 34002 |
| 76 | A0A0H3GQ47 | Transportador de casete de unión a ATP de la superfamilia ABC | 311 | 34010 |
| 77 | A0A0H3GVG5 | Proteína del sistema de captación de zinc de alta afinidad ZnuA | 314 | 34019 |
| 78 | A0A0H3GIE4 | Proteína IolH | 294 | 34087 |
| 79 | A0A0H3GJM3 | Aldo/ceto reductasa | 317 | 34141 |
| 80 | A0A0H3GQE8 | Proteína que contiene el dominio catalítico de la L,D-TPasa | 313 | 34158 |
| 81 | A0A0H3GPQ6 | Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa (RPPK) (EC 2.7.6.1) (5-fosfo-D-ribosil alfa-1-difosfato sintasa) (Fosforribosil difosfato sintasa) (Fosforribosil pirofosfato sintasa) (P-Rib-PP sintasa) (PRPP sintasa) (PRPPasa) | 315 | 34266 |
| 82 | A0A0H3GQ60 | Formimidilglutamasa (EC 3.5.3.8) (Formiminoglutamasa) (Formiminoglutamato hidrolasa) | 318 | 34648 |
| 83 | A0A0H3GHI8 | Quinona oxidoreductasa, dependiente de NADPH | 327 | 35199 |
| 84 | A0A0H3GR62 | Subunidad de la ATP sintasa | 328 | 35337 |
| 85 | A0A0H3GZ50 | Subunidad catalítica de la proteína-metionina-sulfóxido reductasa MsrP (EC 1.8.5.-) | 333 | 37133 |
| 86 | A0A0H3GQH2 | Deshidrogenasa de unión a NAD(P) | 345 | 37191 |
| 87 | A0A0H3GPS4 | Unión periplásmica Regulador transcripcional proteína/LacI | 354 | 37641 |
| 88 | A0A0H3GZU3 | Proteína de unión al sustrato periplásmica del transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada de alta afinidad | 352 | 37668 |
| 89 | A0A0H3GXE8 | Metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina | 343 | 38636 |
| 90 | A0A0H3GQS4 | N-etilmaleimida reductasa | 365 | 39402 |
| 91 | A0A0H3GS51 | Transglucosilasa B de mureína lítica | 359 | 39728 |
| 92 | A0A0H3GLN5 | Adenina desaminasa dihidroorotasa | 377 | 40708 |
| 93 | A0A0H3GKV0 | Proteína periplásmica de unión a putrescina | 370 | 40836 |
| 94 | A0A0H3GXM8 | Proteína de transporte de espermidina/putrescina de tipo ABC | 366 | 40876 |

Continuación del anexo 16.6.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|---|---------------|-----------|
| 95 | A0A0H3GZV6 | Celulasa (EC 3.2.1.4) | 369 | 40901 |
| 96 | A0A0H3GQZ2 | Componente del sistema de captación de hierro EfeO | 375 | 41012 |
| 97 | A0A0H3H3A3 | 1,3-propanodiol oxidorreductasa | 387 | 41466 |
| 98 | A0A0H3GKD0 | dTDP-4-amino-4,6-didesoxigalactosa transaminasa (EC 2.6.1.59) | 376 | 42212 |
| 99 | A0A0H3GR90 | 3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa 1 (EC 2.3.1.41) (3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa I) (Beta-cetoacil-ACP sintasa I) | 406 | 42437 |
| 100 | A0A0H3GPH5 | Cisteína desulfurasa (EC 2.8.1.7) (Selenocisteína beta-liasa) (SCL) (Selenocisteína liasa) (EC 4.4.1.16) (Selenocisteína reductasa) | 406 | 43750 |
| 101 | A0A0H3GXU3 | N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (EC 3.5.1.28) | 417 | 45466 |
| 102 | A0A0H3GRG6 | Quitinasa II | 417 | 45647 |
| 103 | A0A0H3GQ17 | D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa de tipo serina (EC 3.4.16.4) | 423 | 46658 |
| 104 | A0A0H3GRD1 | Timidina fosforilasa (EC 2.4.2.4) (TdRPasa) | 440 | 47045 |
| 105 | A0A0H3GZ27 | peptidasa Do (EC 3.4.21.107) | 455 | 47240 |
| 106 | A0A0H3GHG7 | Maltoporina (Porina inducible por maltosa) | 429 | 47835 |
| 107 | A0A0H3GI97 | Peptidasa PmbA | 446 | 48099 |
| 108 | A0A0H3GM82 | Lipoproteína de membrana enterocidina B | 48 | 4815 |
| 109 | A0A0H3GU61 | Citosina desaminasa | 440 | 48973 |
| 110 | A0A0H3GVZ5 | Proteína de utilización de etanolamina | 467 | 49073 |
| 111 | A0A0H3GX24 | Carboxipeptidasa dependiente de Zn | 433 | 49571 |
| 112 | A0A0H3GXV1 | Fosfoenolpiruvato-glicerona fosfotransferasa (EC 2.7.1.121) | 473 | 50436 |
| 113 | A0A0H3GVJ9 | Proteína que contiene repeticiones WG | 442 | 50501 |
| 114 | A0A0H3GRZ9 | Piruvato quinasa (EC 2.7.1.40) | 480 | 51422 |
| 115 | A0A0H3GSK2 | Ensamblaje de la superficie de la cápsula | 477 | 52817 |
| 116 | A0A0H3GM33 | Catabolismo del 4-hidroxifenilacetato | 488 | 53011 |
| 117 | A0A0H3GQY0 | Transportador de la membrana externa de hierro-catecolato férrico | 481 | 53017 |
| 118 | A0A0H3GW14 | Proteasa potenciadora del ensamblaje del barril beta (EC 3.4.-.-) | 487 | 53590 |
| 119 | A0A0H3GV14 | Trehalosa-6-fosfato sintasa (EC 2.4.1.15) (Proteína A de síntesis de trehalosa osmorreguladora) (UDP-glucosa-glucosafosfato glucosiltransferasa) | 474 | 53813 |
| 120 | A0A0H3GQX2 | ATPasa | 500 | 54150 |
| 121 | A0A0H3GV47 | Nucleosidasa de AMP (EC 3.2.2.4) | 484 | 54230 |
| 122 | A0A0H3GLS3 | Probable aminopeptidasa del citosol (EC 3.4.11.1) (Leucina aminopeptidasa) (LAP) (EC 3.4.11.10) (Leucil aminopeptidasa) | 503 | 54848 |
| 123 | A0A0H3GX07 | Proteína de unión al sustrato periplásmica del transportador ABC de níquel | 522 | 58205 |
| 124 | A0A0H3GS77 | Alfa-amilasa citoplasmática | 514 | 58275 |
| 125 | A0A0H3GXU4 | Glicerol deshidratasa | 555 | 60660 |
| 126 | A0A0H3GKA3 | Transportador de vitamina B12 BtuB (Receptor de cobalamina) (Translocador de cobalamina de la membrana externa) | 612 | 68126 |
| 127 | A0A0H3GLH7 | Receptor dependiente de TonB | 729 | 80474 |
| 128 | A0A0H3GPD9 | Lisina descarboxilasa 1 | 715 | 81386 |
| 129 | A0A0H3GJU6 | Receptor de ferrinterobactina | 742 | 82325 |
| 130 | A0A0H3H263 | Proteína que contiene el dominio similar a SH3 de lipoproteína YgdI/YgdR | 76 | 8283 |
| 131 | A0A0H3GNA8 | Receptor de sideróforo de catecolato Fiu | 772 | 82908 |
| 132 | A0A0H3GLX0 | Proteína UPF0337 YjbJ | 69 | 8308 |
| 133 | A0A0H3GVY8 | Catalasa (EC 1.11.1.6) | 752 | 83471 |
| 134 | A0A0H3GNK3 | Sin caracterizar Proteína | 74 | 8451 |
| 135 | A0A0H3GS89 | Porina de membrana externa para enterobactina férrica y colicinas B y D | 787 | 86334 |
| 136 | A0A0H3GGV4 | Subunidad alfa de la formiato deshidrogenasa-O | 804 | 89363 |
| 137 | A0A0H3GNJ8 | Factor de ensamblaje de proteínas de membrana externa BamA | 809 | 89983 |
| 138 | A0A0H3GUY3 | Proteína acomodadora fimbrial | 828 | 90772 |
| 139 | A0A0H3GT82 | Proteína que contiene dominio similar a YdgH/BhsA/McbA | 90 | 9533 |
| 140 | A0A0H3H1B0 | Proteína de desintoxicación | 96 | 9839 |
| 141 | A0A0H3GMN6 | Componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (EC 1.2.4.1) | 887 | 99434 |
| 142 | A0A0H3GYL9 | Transportador de casete de unión a ATP de la superfamilia ABC de dipéptidos, proteína de unión | 96 | 9976 |

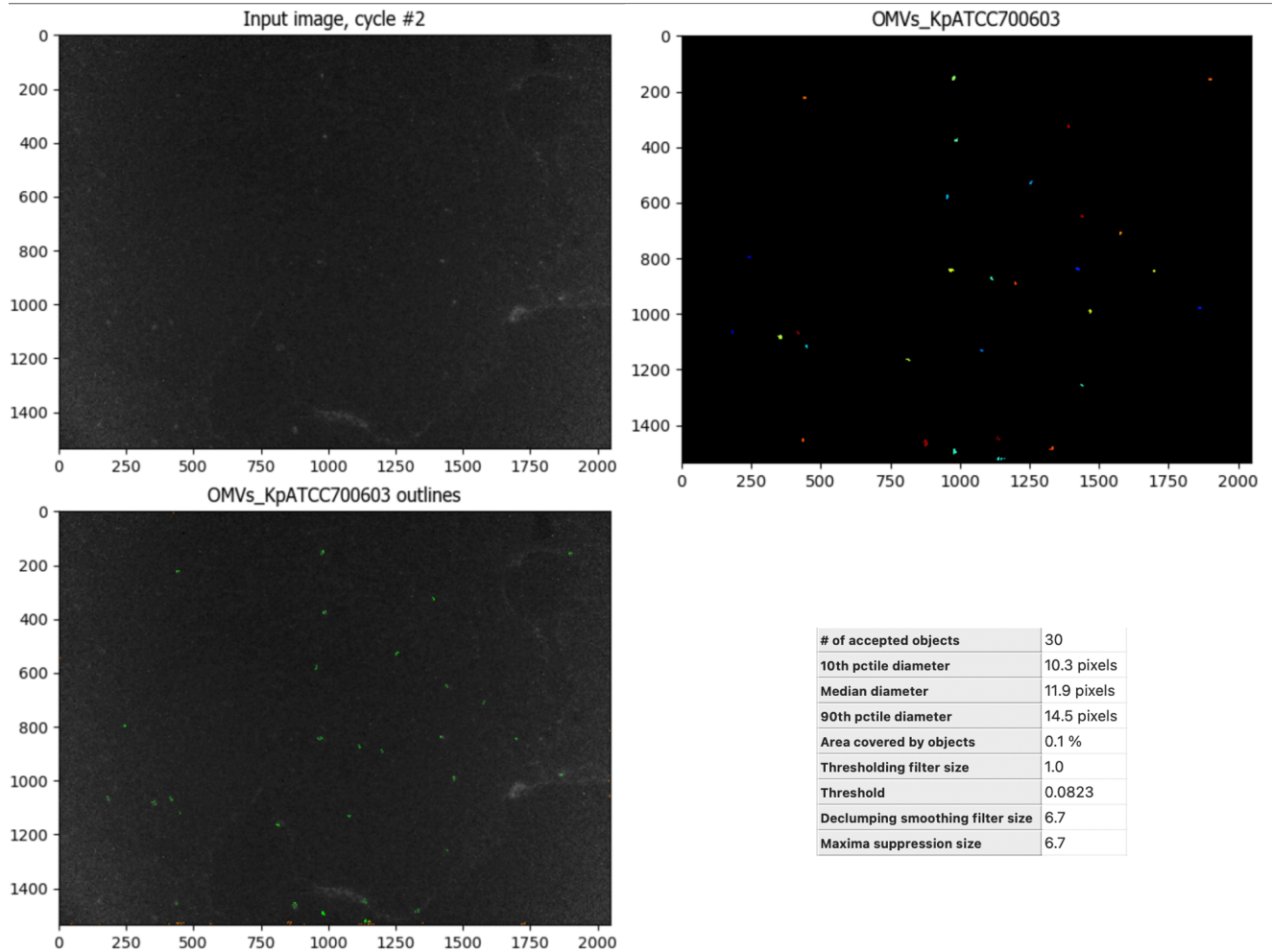
16.7 Nombre de las 5 proteínas propias de las OMVs de KpBUAP003.

| No. | ID | Nombres de proteínas | Longitud (AA) | Masa (Da) |
|-----|------------|---|---------------|-----------|
| 1 | A0A0H3GM17 | LysC | 48 | 5205 |
| 2 | A0A0H3GQF2 | Proteína no caracterizada | 48 | 5213 |
| 3 | A0A0H3GVU2 | Familia 2 de las glucosiltransferasas | 93 | 10681 |
| 4 | A0A0H3GMY9 | Proteína estructural | 164 | 18225 |
| 5 | A0A0H3GVZ1 | Metionina-ARNt ligasa (EC 6.1.1.10) (Metionil-ARNt sintetasa) (MetRS) | 637 | 71577 |

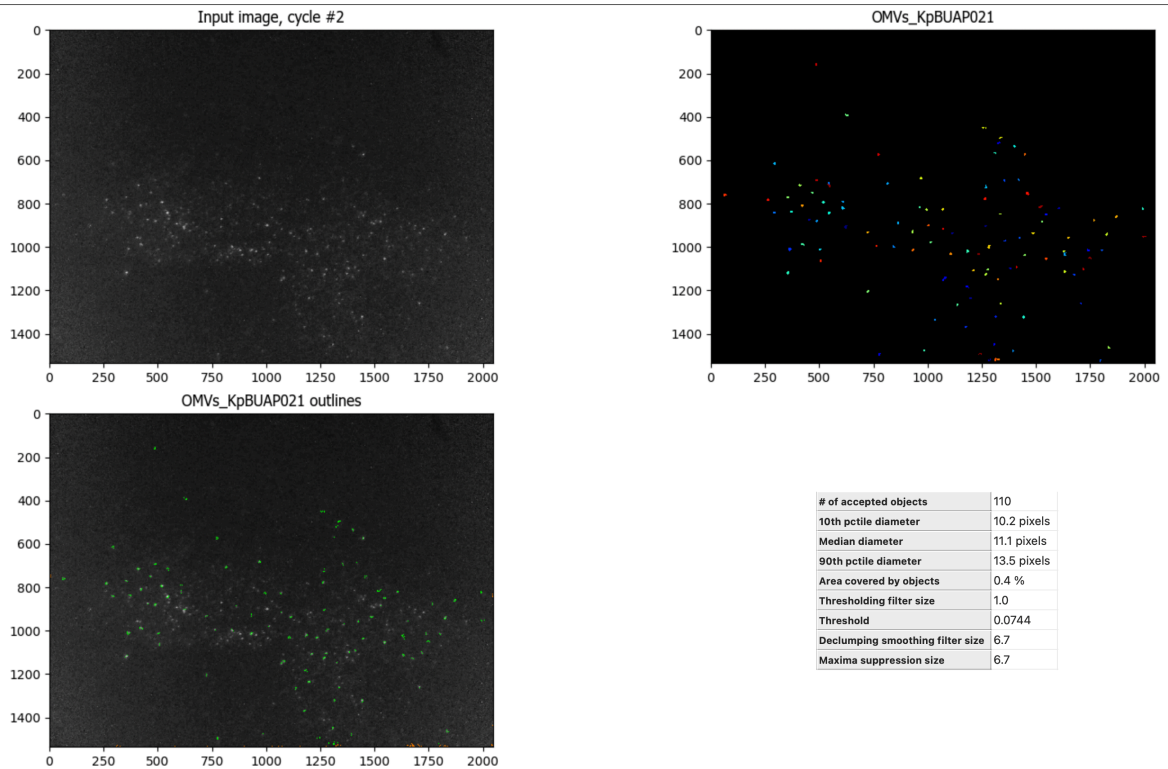
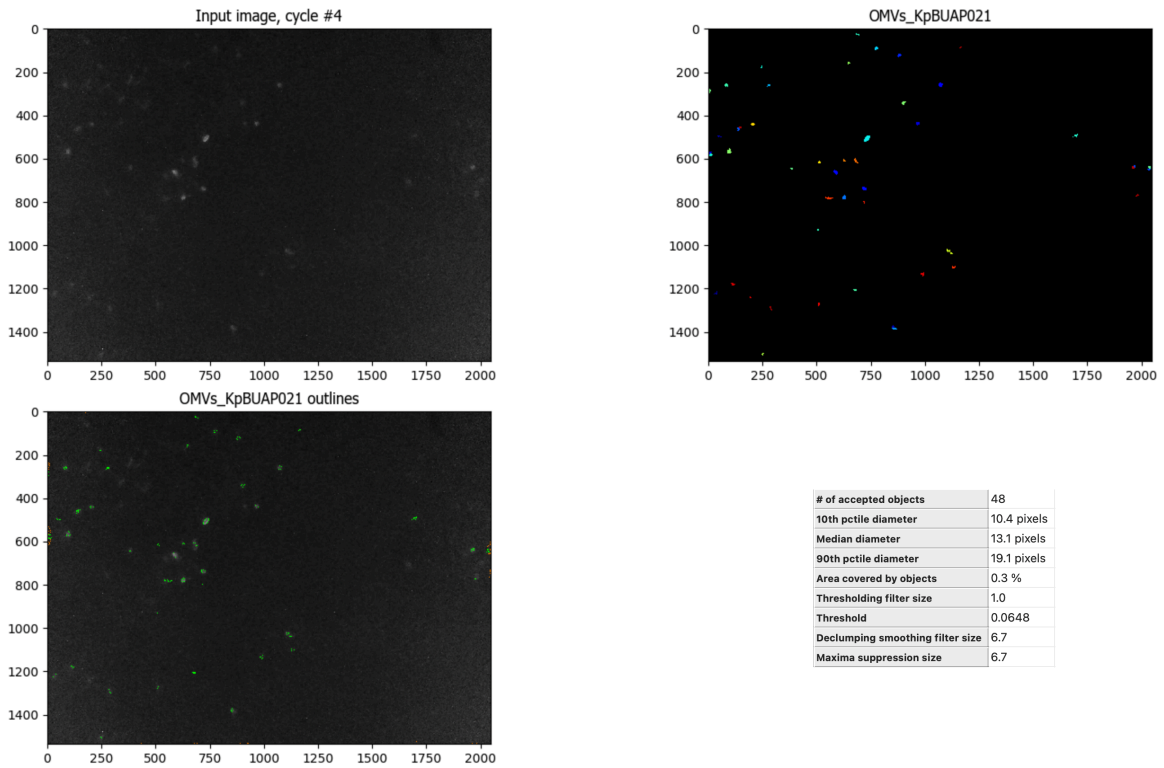
16.8 Tabla de resultados del análisis de inmunogenicidad en el software VaxiJen v3.0 de las posibles proteínas reconocidas en el Western blot.

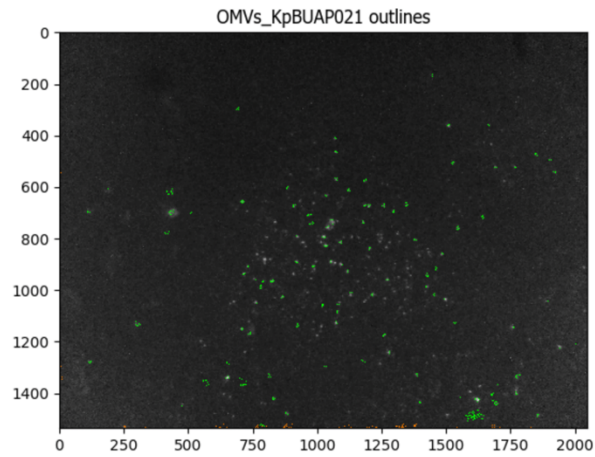
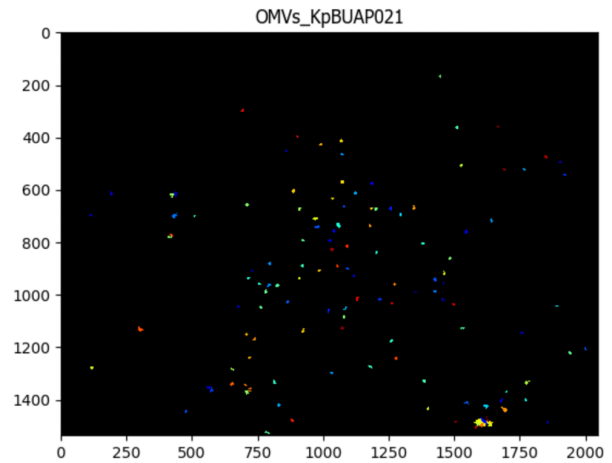
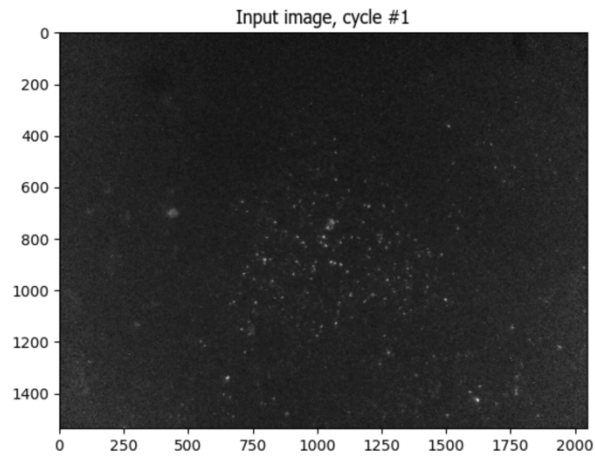
| No. | ID | Masa (Da) | Resultado VaxiJen v3.0 |
|-----|------------|-----------|---|
| 1 | A0A0H3GWI0 | 35486 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 2 | A0A0H3H0T6 | 36916 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 3 | A0A0H3GWF8 | 34558 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 4 | A0A0H3GWA1 | 32426 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 66% |
| 5 | A0A0H3H0J6 | 31513 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 6 | A0A0H3GXB9 | 35634 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 7 | A0A0H3GX74 | 35063 | INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 8 | A0A0H3GWL1 | 36364 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 9 | A0A0H3GXB1 | 33575 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 10 | A0A0H3GIJ5 | 30450 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 11 | A0A0H3GGS8 | 31017 | INMUNÓGENO con una probabilidad del 66%. |
| 12 | A0A0H3GTY9 | 35290 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 13 | A0A0H3GMB4 | 35266 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 14 | A0A0H3GN34 | 35471 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 66% |
| 15 | A0A0H3GTJ1 | 35928 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 66% |
| 16 | A0A0H3GMF6 | 32291 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 17 | A0A0H3GQQ0 | 33317 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 18 | A0A0H3GTI2 | 33247 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 19 | A0A0H3GQA5 | 48002 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 20 | A0A0H3H458 | 48213 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 66% |
| 21 | A0A0H3GZJ7 | 48521 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 22 | A0A0H3H498 | 48661 | INMUNÓGENO con una probabilidad del 66% |
| 23 | A0A0H3GTW5 | 49271 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 24 | A0A0H3GWQ1 | 45056 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 25 | A0A0H3GV01 | 46099 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 26 | A0A0H3GTF8 | 48297 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 27 | A0A0H3GVB1 | 49058 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 28 | A0A0H3GSQ9 | 49436 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 29 | A0A0H3GXZ5 | 49911 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 30 | A0A0H3GSS3 | 51894 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 31 | A0A0H3GSX3 | 71093 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 32 | A0A0H3GY70 | 71863 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 33 | A0A0H3GW02 | 72182 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 34 | A0A0H3GIW3 | 73160 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 35 | A0A0H3GIW3 | 73160 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 36 | A0A0H3GY04 | 76846 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 37 | A0A0H3GWM9 | 77543 | NO INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 38 | A0A0H3GQ65 | 78966 | INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |
| 39 | A0A0H3GKA3 | 68126 | INMUNÓGENO con una probabilidad del 100% |

16.9 Imágenes de las inmunofluorescencias obtenidas de KpATCC700603 con su anticuerpo homólogo (anti-OMVsATTC).



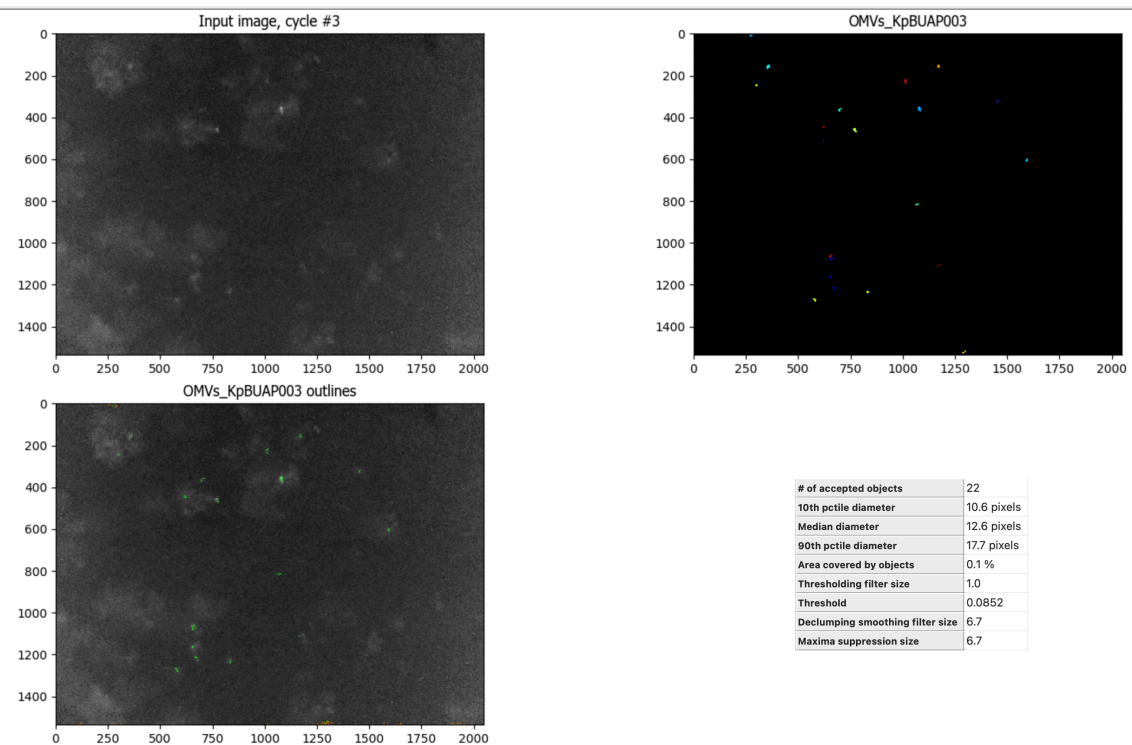
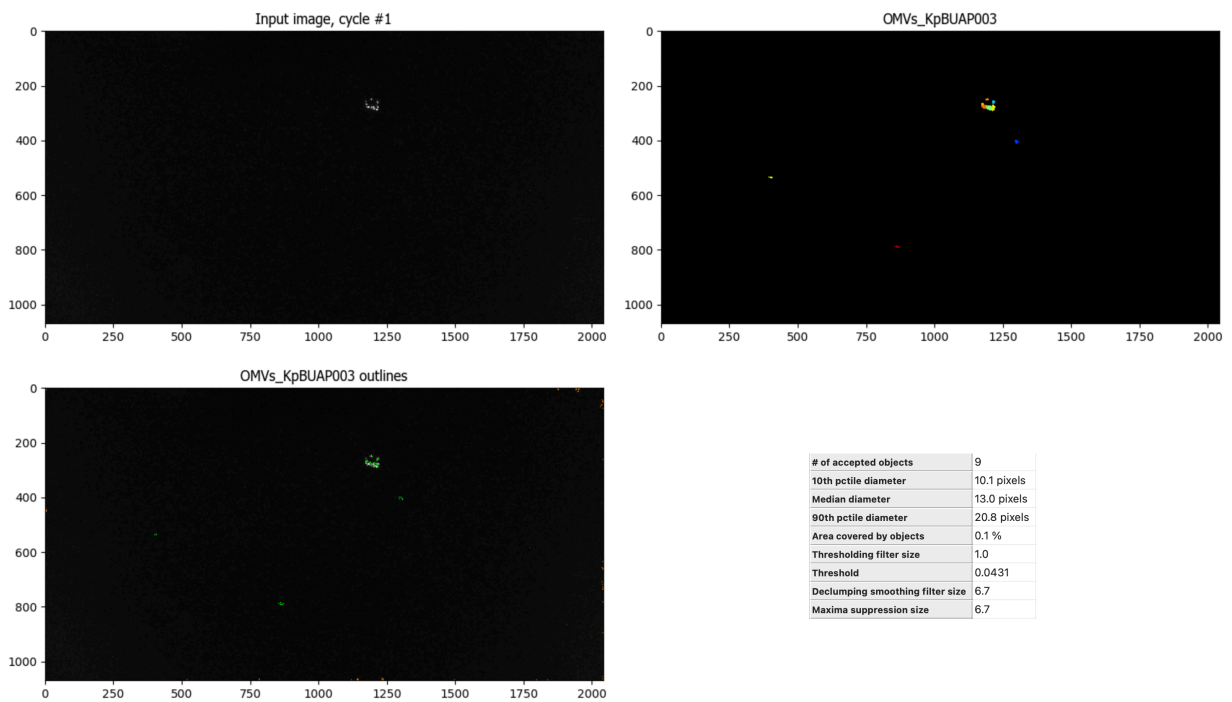
16.10 Imágenes de las inmunofluorescencias obtenidas de KpBUAP021 con su anticuerpo homólogo (anti-OMVs021).

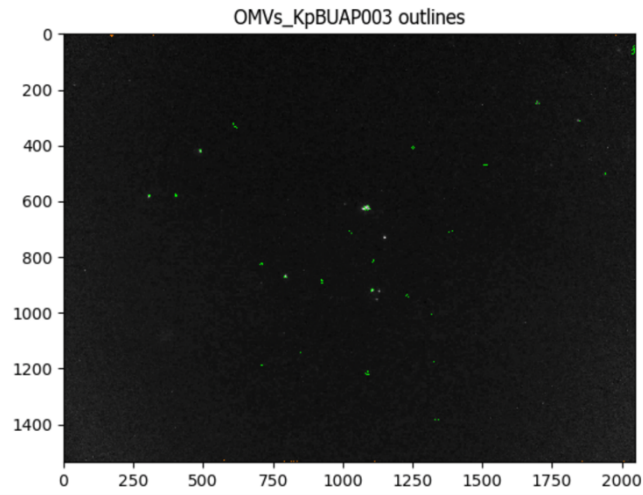
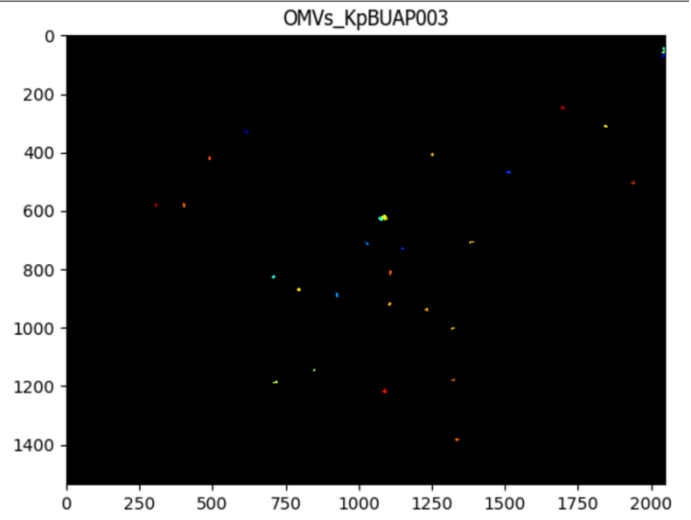
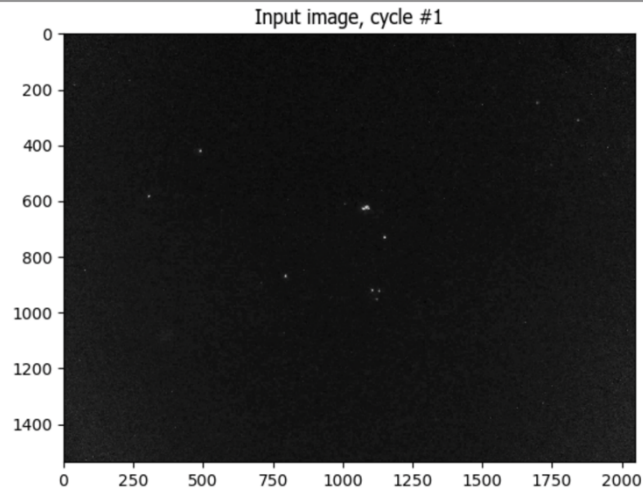




| | |
|----------------------------------|-------------|
| # of accepted objects | 128 |
| 10th pctile diameter | 10.2 pixels |
| Median diameter | 11.6 pixels |
| 90th pctile diameter | 15.1 pixels |
| Area covered by objects | 0.5 % |
| Thresholding filter size | 1.0 |
| Threshold | 0.0834 |
| Declumping smoothing filter size | 6.7 |
| Maxima suppression size | 6.7 |

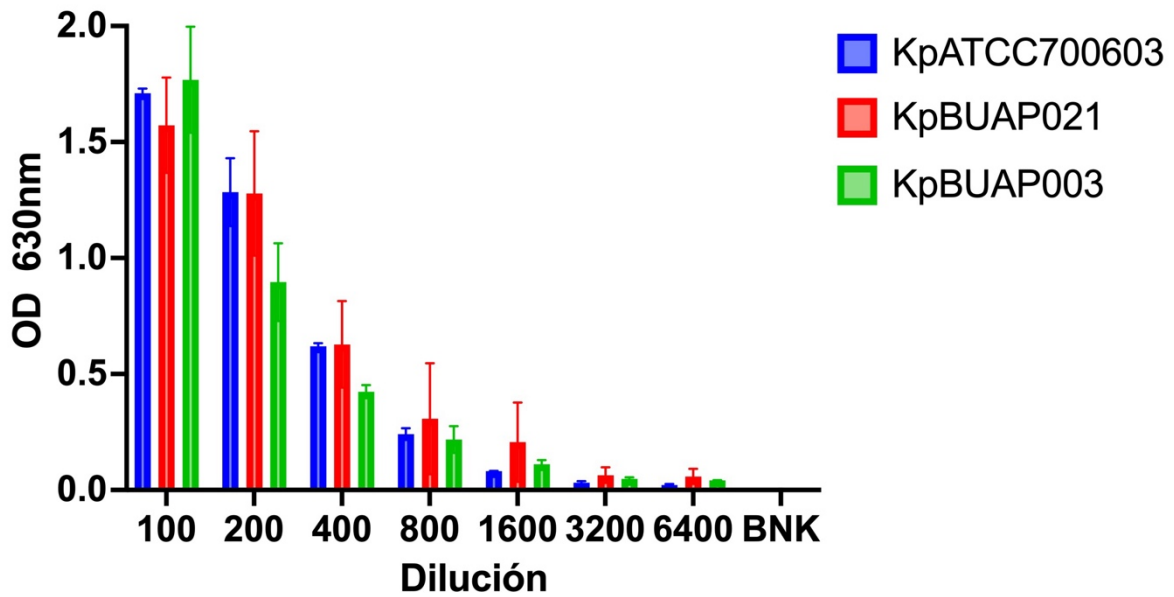
16.11 Imágenes de las inmunofluorescencias obtenidas de KpBUAP003 con su anticuerpo homólogo (anti-OMVs003).



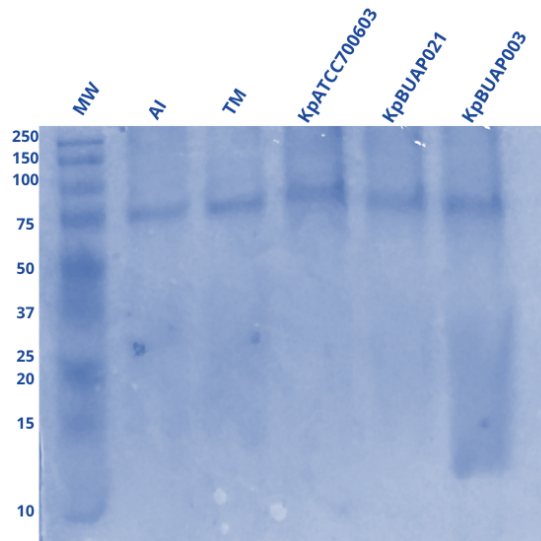


| | |
|----------------------------------|-------------|
| # of accepted objects | 29 |
| 10th pctile diameter | 10.2 pixels |
| Median diameter | 11.0 pixels |
| 90th pctile diameter | 13.9 pixels |
| Area covered by objects | 0.1 % |
| Thresholding filter size | 1.0 |
| Threshold | 0.0483 |
| Declumping smoothing filter size | 6.7 |
| Maxima suppression size | 6.7 |

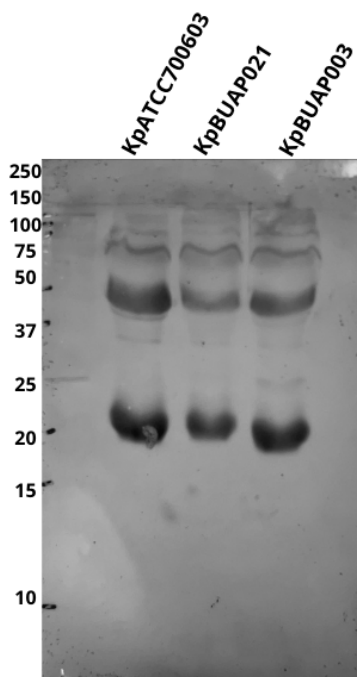
16.12 Títulos de los anticuerpos anti-OMVs semana 7, posterior a la purificación.



16.13 SDS-PAGE al 12% de los anticuerpos anti-OMVs semana 7, posterior a la purificación.



16.14 Western blot de los anticuerpos anti-OMVs semana 7, posterior a la purificación.



16.15 Tabla de las proteínas con actividad *moonlighting* presentes en las OMVs de las tres cepas, a partir de la base de datos MoonDB.

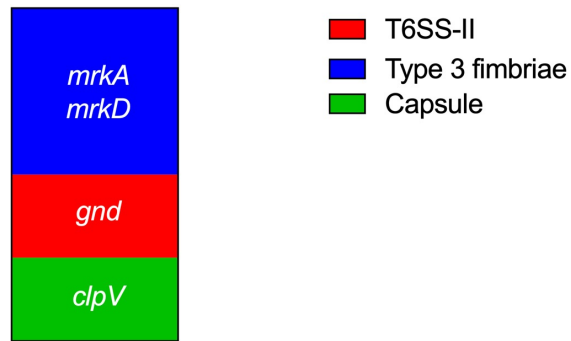
| No. | ID | Nombres de la proteína | Función moonlight 1 MoonDB | Función moonlight 2 MoonDB | MoonDB ID | Especie |
|-----|------------|--|--|--|--------------------------|----------------------------------|
| 1 | A0A0H3H2Q3 | Fosfoglicerato quinasa | Enzima glucolítica | Plasmina reductasa. Proteína cofactor de la polimerasa alfa. Condición: cáncer (segregada) | 56 | HUMAN |
| 2 | A0A0H3GVC8 | Fructosa-bisfosfato aldolasa (FBP aldolasa) (FBP aldolase) | Enzima glucolítica | Influye en la forma celular y en la distribución de vesículas ácidas. Desempeña un papel en el ensamblaje y la regulación de las V-ATPasas, que son bombas de protones que utilizan la hidrólisis del ATP para sacar los protones del citosol. | 153 | HUMAN |
| 3 | A0A0H3GV85 | | | Se une a la H+ATPasa vacuolar (V-ATPasa). | 298 | YEAST |
| 4 | A0A0H3GUG9 | Enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) (2-fosfoglicerato deshidratasa) | Enzima glucolítica | Regula el crecimiento, la tolerancia a la hipoxia y las respuestas alérgicas. Actúa como receptor y activador del plasminógeno en diversas células, estimula la producción de inmunoglobulina, se une al promotor myc como represor transcripcional y puede funcionar como supresor tumoral. | 68 | HUMAN |
| | | | | Receptor de plasminógeno. Condición: localización en la pared celular. | 293 314 327 | YEAST YEAST YEAST |
| 5 | A0A0H3GUU1 | Piruvato quinasa | Enzima glucolítica. Condición: presencia en forma tetramérica. | Proteína transportadora de hormona tiroidea que regula las respuestas transcripcionales del receptor de la hormona tiroidea. Condición: presencia en forma monomérica. | 43 | HUMAN |
| 6 | A0A0H3GTY9 | Alcohol deshidrogenasa (ADH) | Enzima metabólica del alcohol | Se une al plasminógeno, la fibronectina y la vitronectina. Condición: localizada en la superficie celular | 284 306 | YEAST YEAST |
| 7 | A0A0H3GN34 | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | Enzima glucolítica. Condición: forma monomérica. | Participa en eventos nucleares, como la transcripción, el transporte de ARN, la replicación del ADN y la apoptosis. Condición: forma tetramérica | 101 | HUMAN |
| | | | Enzima glucolítica | Se unen a las proteínas fibronectina y laminina. Condición: localizada en la superficie celular | 285 302 311 322 | YEAST YEAST YEAST YEAST |
| 8 | A0A0H3GGT9 | "Glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) (Fosfoglucosa isomerasa) (PGI) (Fosfohexosa isomerasa) (PHI)" | Enzima glucolítica. Condición: localización en el citosol | Citocina secretada por tumores. Neuroleucina, factor de movilidad autocrina, factor de crecimiento nervioso, mediador de la diferenciación y la maduración. Condición: localización extracelular | 5 | HUMAN |

16.16 Tabla de las proteínas con actividad *moonlighting* presentes en las OMVs de las tres cepas, a partir de la base de datos MoonProt.

Debido al tamaño de la tabla sobre las funciones *moonlighting* se decidió conservar el archivo en formato excel que se puede consultar en el siguiente link:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/11cXaTy27_tqEwERGuwCbcMztOLqI0Or-/edit?usp=sharing&ouid=116988270894658452104&rtpof=true&sd=true

16.17 Factores de virulencia presentes en las OMVs de las tres cepas.



Total = 4

16.18 Participaciones académicas.



Gobierno de Puebla
Hacer historia. Hacer futuro.



Secretaría
de Educación



CONCYTEP
Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla



**Jóvenes
Investigadores**

El Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla,
otorga el presente

RECONOCIMIENTO A:


**Espinosa Hernández Sofía, Sánchez Palacios Dulce María,
Carabarin Lima Alejandro**

Por haber obtenido el **Segundo lugar** con el proyecto "Evaluación de anticuerpos anti-microvesículas usados como agentes terapéuticos para disminuir la multidrogresistencia en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*" en el área de **Medicina y Ciencias de la salud** en el Tercer Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores 2022: Modalidad Virtual, el cual se llevó a cabo el 7 y 8 de noviembre de 2022.

Atentamente
H. Puebla de Zaragoza, a 08 de noviembre de 2022



Dr. Victoriano Gabriel Covarrubias Salvatori
Director General del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla



La Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, A.C.
Otorga la presente


CONSTANCIA

A: Sofia Espinosa Hernández, Itzel Oliany Gutiérrez Santos, Lizbeth Salazar Villatoro3, Martha Espinosa Cantellano, Jose Luis Rosales Encina, Patricia Lozano Zaráin, Ygnacio Martínez Laguna, Alejandro Carabarin Lima


Por haber obtenido el **3er Lugar** en la categoría de **Investigación Básica** con el trabajo:

Análisis molecular de la transferencia horizontal de genes de resistencia a β lactamasas mediante OMV's de *Klebsiella pneumoniae*


En el XLI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica "Dr. José Luis Castañeda Narváez"
XII Simposio Hispano-Mexicano de Infectología Pediátrica
XXIX Simposio Nacional de Microbiología Clínica
XXXIII Simposio Interamericano de Enfermería Infectológica
I Simposio en Investigación en Infectología Pediátrica
30 de noviembre al 02 de diciembre del 2023, Centro de Convenciones de San Luis Potosí



Dr. Enrique Rodríguez Barragán
Presidente




Dr. Ismael Fco. Herrera Benavente
Secretario General




UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

**FACULTAD DE
MEDICINA**



AMPE
ASOCIACIÓN MEXICANA DE PEDIATRÍA



**COLEGIO DE PEDIATRÍA
SAN LUIS POTOSÍ**

THE JENNER INSTITUTE

Old Road Campus Research Building
Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ

Email: cesar.lopez-camacho@ndm.ox.ac.uk
Website: <https://www.jenner.ac.uk/team/cesar-lopez-camacho>

Dr. César López-Camacho
mRNA technologies Group Leader



17.11.23

Re: Letter to certify visit to Jenner Institute

To whom it may concern,

Re: Certification of Past Attendance for Sofía Espinosa Hernández

We write to confirm that Ms. Sofía Espinosa Hernández was formally invited and attended a collaborative stay period with our team at the Jenner Institute. This collaboration was centered around a significant research project in the field of mRNA and LNPs.

Details of the Visit:

Project Title: "Improving mRNA Vaccine Delivery through Lipid Nanoparticle Formulations: A Study on Optimizing LNP Formulation to Enhance GFP Expression in Cells."

Duration of Visit: 8 weeks commencing on the 10th of Sep 2023.

Purpose of Visit: Ms. Espinosa Hernández worked closely with our research team, contributing her expertise to the project.

Her participation at our institute greatly enriched the project and fostered a synergistic environment for advanced research in molecular biology and immunology. Her involvement was of significant value, leading to substantial advancements in the field.

This letter serves as a formal acknowledgment of her attendance and collaboration during the stated period. Ms. Espinosa Hernández's presence was a valuable addition to our team. Should you require any further information or confirmation regarding Ms. Espinosa Hernández's past visit, please do not hesitate to contact us.

Yours sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Cesar Lopez-Camacho'.

Dr. César López-Camacho



THE JENNER INSTITUTE - DEVELOPING INNOVATIVE VACCINES
A Partnership between Oxford University and the Institute for Animal Health



La Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica, A.C.
Otorga la presente

CONSTANCIA



ASOCIACION MEXICANA DE PEDIATRIA



A: SOFIA ESPINOSA HERNÁNDEZ, ITZEL OLIANY GUTIÉRREZ SANTOS, LIZBETH SALAZAR VILLATORO, MARTHA ESPINOSA CANTELLANO, JOSE LUIS ROSALES ENCINA, PATRICIA LOZANO ZARAÍN, YGNACIO MARTÍNEZ LAGUNA, ALEJANDRO CARABARIN LIMA

Por su participación en Trabajos Libres con el trabajo:

Análisis molecular de la transferencia horizontal de genes de resistencia a beta-lactamasas mediante OMV's de *Klebsiella pneumoniae*

Estamos agradecidos por la alta calidad de su presentación, la cual contribuyó al éxito del congreso

En el XLI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica "Dr. José Luis Castañeda Narváez"
XII Simposio Hispano-Mexicano de Infectología Pediátrica
XXIX Simposio Nacional de Microbiología Clínica
XXXIII Simposio Interamericano de Enfermería Infectológica
I Simposio en Investigación en Infectología Pediátrica
30 de noviembre al 02 de diciembre del 2023, Centro de Convenciones de San Luis Potosí

Dr. Enrique Rodríguez Barragán
Presidente

Dr. Ismael Fco. Herrera Benavente
Secretario General

XLVIII
CONGRESO NACIONAL
DE INFECTOLOGÍA
Y MICROBIOLOGÍA
CLÍNICA

OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA A:

SOFIA ESPINOSA HERNÁNDEZ

Martha Espinosa Cantellano, Lizbeth Salazar Villatoro, Jose Luis Rosales Encina, Patricia Lozano Zaráin, Ygnacio Martínez Laguna, Alejandro Carabarin Lima, Uriel de Jesús Velázquez Hernández, Johana Paola Hernandez Gonzalez.

Por la presentación del Trabajo de Investigación

1. Comprensión de mecanismos sobre resistencia a antibióticos, virulencia e inmunomodulación mediada por Microvesículas (OMV's) secretadas de *Klebsiella pneumoniae*

XLVIII CONGRESO NACIONAL DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
en el Centro de Convenciones William O Jenkins

Puebla
22 AL 25 DE MAYO 2024

Dra. Dorá Patricia Cornejo Juárez
Presidente AMIMC

Dra. Rosa María Wong Chew
Vicepresidenta de la AMIMC





asociación mexicana de profesores de
microbiología y parasitología a.c.

OTORGA EL PRESENTE



Reconocimiento

A: Sofia Espinosa Hernández, González VMC, Salazar VL, Espinosa CM, Rosales EJM, Lozano ZP, Martínez LY y Carabarin LA

Por haber obtenido el **1er. lugar en la Categoría Posgrado** en la presentación de carteles con el título:
"Evaluación de la respuesta inmune humoral mediada por las vesículas de la membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* y su impacto en los mecanismos de patogenicidad bacteriana"



Durante las actividades de la:
CIX Reunión Anual y II Internacional de Profesores de Microbiología y Parasitología
XIX Congreso Nacional de Estudiantes de Microbiología y Parasitología
celebrada en conjunto con la Universidad Autónoma de Guerrero
y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

ACAPULCO, GRO. DEL 19 AL 21 DE SEPTIEMBRE DE 2024

Dr. Elias B. Pezzat Said
PRESIDENTE AMPMPAC



ASOCIACION MEXICANA DE
PROFESORES DE MICROBIOLOGIA
Y PARASITOLOGIA, A.C.
Fundada desde 1952

M.C. José Manuel Rodríguez Luna
SECRETARIO AMPMPAC