



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE GENES
Y PROTEÍNAS MEDIADA POR OMV'S PURIFICADAS
DE *Klebsiella pneumoniae***

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

C. ITZEL OLIANY GUTIÉRREZ SANTOS

DIRECTOR DE TESIS:

D. C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D. C. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ



PUEBLA, PUE.

ABRIL 2024

Agradecimientos

A mi amada mamá Olivia, quien ha sido mi pilar de fortaleza y el faro que ha guiado cada paso de este camino. Tu sacrificio, inquebrantable apoyo y fe en mí son las fuerzas que me impulsan. Te dedico este logro con todo mi corazón y gratitud.

A mi querida hermana, gracias por ser mi compañera de vida y confidente. Tu apoyo constante ha sido mi mayor fortaleza, agradezco cada risa compartida y cada abrazo reconfortante. Este logro también es tuyo.

A mi director de tesis, Dr. Alejandro Carabarán Lima, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme tantas enseñanzas, por su tiempo, dedicación y paciencia en la elaboración de todo el proyecto.

A la Dra. María Cristina González Vázquez, gracias por todo el apoyo y guía que me brindó durante todo este tiempo.

A mis compañeras de laboratorio, Sofi y Aylin por brindarme su amistad y apoyarme en todo momento.

A mis amigos de la universidad; Zoe, Fer, Xia, Kari, Lizzy, Etza, pero sobre todo a Alex y Aidé por haber hecho mi tiempo en la uni tan grato, gracias por todos los momentos vividos.

A mis abuelos maternos, Gloria y Juan cuyo amor y ejemplo han sido mi guía constante. Gracias por cuidarme y apoyarme tantos años, les debo lo que soy.

A mis abuelos paternos, Isabel y Mario, gracias por demostrarme amor y dulzura hasta su último aliento.

A mi novio por ser una persona tan especial en mi vida, gracias por tu apoyo desde mi primer día, por tu paciencia y amor los cuales fueron parte importante para poder terminar este proyecto.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser mi *alma mater*, por proporcionarme tantos años de buenos momentos, aprendizajes y conocimiento que me han enriquecido como persona y profesionista.

*A las mujeres de mi vida:
Mis abuelas, mi madre y mi hermana.*

Contenido

Agradecimientos	2
Índice de tablas	5
Índice de figuras	6
Resumen	8
1. Introducción	9
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
1.2 Patogenicidad de <i>K. pneumoniae</i>	10
1.3 Mecanismos de defensa de <i>K. pneumoniae</i> contra los antimicrobianos	11
1.4 Microvesículas de membrana externa (OMV's).....	13
1.4.1 Biogénesis	14
1.4.2 Patogénesis mediada por OMV's	15
1.4.3 Resistencia a los antibióticos mediada por las OMV's.....	16
2. Antecedentes	18
2.1 Antecedentes generales	18
3. Justificación	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	20
6. Objetivos particulares	20
7. Materiales y métodos	21
7.1 Resembrado de cepas de aislados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i>	21
7.2 Expresión de OMV's.....	21
7.3 Purificación de OMV's mediante centrifugación diferencial y membranas de nylon. 22	
7.4 Tinción de Gram modificada	22
7.5 Determinación de la concentración de las OMV's de <i>K. pneumoniae</i>	23
7.6 Ensayo de protección a una cepa susceptible de <i>Escherichia coli</i>	24
7.7 Cuantificación del crecimiento de <i>E. coli</i>	24
7.8 Inmunofluorescencia indirecta en OMV's y en bacterias de <i>K. pneumoniae</i>	25
7.8.1 Inmunofluorescencia indirecta con tratamientos de DNAsa o Proteinasa K.....	26
7.9 Antibiogramas en <i>E. coli</i> recuperadas del ensayo de protección	26
7.10 Extracción de DNA genómico de <i>E. coli</i> recuperada de los ensayos de protección con OMV's.....	27

7.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	27
8. Resultados	29
8.1 Expresión de OMV's	29
8.2 Cuantificación de OMV's.....	29
8.3 Ensayo de protección.....	30
8.4 Monitoreo del crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 α	31
8.5 Inmunofluorescencia indirecta	33
8.6 Pruebas de Antibiogramas	37
8.7 Extracción de DNA genómico	42
8.8 PCR.....	42
9 Discusión	44
10. Conclusiones	51
11. Perspectivas	52
12. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos	52
13. Anexos	55
14. Bibliografía	59

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1	Volumen adicionado en cada pocillo para la cuantificación de las OMV's	23
2	Concentraciones de antibióticos implementados en el antibiograma.	26
3	Condiciones del termociclador para PCR utilizados para amplificar los diversos genes.	27
4	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos	28
5	Concentraciones obtenidas de las OMV's en 5 μ l	29
6	Crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 α en placas	30
7	Monitoreo del crecimiento de <i>E. coli</i> DH5 α	31

8	Perfil de resistencia antimicrobiano de <i>las bacterias sembradas en placa</i>	39
9	Perfil de resistencia antimicrobiano de <i>las bacterias sembradas en tubos</i>	40
N1	Resistencia a antibióticos de cepas <i>Klebsiella pneumoniae</i> aisladas de pacientes con infección nosocomial del Hospital de la mujer.	54

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Factores de virulencia caracterizados en cepas de <i>K. pneumoniae</i> clásicas e hipervirulentas.	11
2	Estructura de las microvesículas de membrana externa	13
3	Representación de la formación y liberación de las OMV's	14
4	Mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por las microvesículas de membrana externa.	17
5	Protocolo de tinción de Gram modificado	21
6	Tinción de Gram modificada (100 X)	29
7	Cuantificación del crecimiento de <i>E. coli</i>	32
8	Análisis Tukey	32
9	Modelo sugerido de los mecanismos de transferencia genética en las OMV's a las bacterias.	33
10	Inmunofluorescencia indirecta	36
11	Electroforesis de gel de agarosa al 1% del DNA genómico obtenido	42
12	Electroforesis de gel de agarosa al 1% del amplificado del gen <i>bla_{TEM}</i>	43
13	Electroforesis de gel de agarosa al 1% del amplificado del gen <i>bla_{KPC}</i>	44

N2	Ensayo de sensidiscos de las bacterias sembradas en placas.	55
N3	Ensayo de sensidiscos de las bacterias sembradas en tubos	56

Resumen

Klebsiella pneumoniae, una bacteria oportunista Gram-negativa, es objeto de numerosos estudios clínicos debido a su capacidad para causar diversas infecciones y su rápida adquisición de resistencia a antimicrobianos. Las microvesículas de membrana externa (OMV's), estructuras esféricas de tamaño nanométrico secretadas por bacterias Gram-negativas, han despertado interés por su capacidad para transportar biomoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos. En este estudio, se busca comprender la importancia de las OMV's en el transporte de genes de resistencia a cepas susceptibles. Para lograr este objetivo, se indujo la sobreexpresión de las OMV's mediante estrés con antibiótico, seguido de su purificación mediante centrifugación diferencial y filtración. Se llevaron a cabo tratamientos con DNasa y Proteinasa K para detectar la presencia de DNA y proteínas externas, respectivamente. Posteriormente, se realizaron ensayos de protección mediados por OMV's en una cepa susceptible a antibióticos, seguidos de pruebas con antibiogramas para determinar la transferencia de resistencia a la bacteria susceptible. Además, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta para confirmar la presencia de proteínas externas. Finalmente, se amplificaron los genes codificantes para resistencia a beta-lactámicos en *K. pneumoniae*. Los resultados obtenidos demuestran que *K. pneumoniae* es capaz de secretar OMV's en respuesta al estrés por antibiótico, y que estas microvesículas contienen proteínas externas esenciales para su funcionalidad, además de ser capaces de transferir genes codificantes para betalactamasas a otros géneros bacterianos.

1. Introducción

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, no móvil. Fue descubierta en 1882 por Carl Friedlander. Este la aisló de los pulmones de una persona que había muerto de neumonía. *K. pneumoniae* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y es un colonizador natural del microbioma del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Además, esta bacteria se puede encontrar en agua, suelo o ambientes hospitalarios, principalmente en las manos del personal hospitalario (Bengoechea & Sa Pessoa, 2019; Lucena et al., 2023,).

En humanos puede causar diversas enfermedades, principalmente infecciones nosocomiales. *K. pneumoniae* coloniza rápidamente las superficies mucosas como el tracto gastrointestinal y la orofaringe. Una vez ubicado en estos sitios, puede llegar a ingresar a otros tejidos y causar infecciones graves (Paczosa & Mecsas, 2016).

K. pneumoniae junto con otros microorganismos; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Enterobacter* y *Escherichia coli*, forman parte del grupo ESKAPE. Estos patógenos son considerados como los más preocupantes en relación con la resistencia a antibióticos, debido a que han adquirido mecanismos de resistencia a la mayoría de los antibióticos utilizados en la clínica (Arato et al., 2021; Navon-Venezia et al., 2017)

La mayoría de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* están relacionadas con hospitales, principalmente por bacterias multidrogoresistentes (MDR), frecuentemente son causadas por cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los organismos productores de BLEE provocan complicaciones al efectuar pruebas precisas de susceptibilidad a antimicrobianos, disminuye las opciones de tratamientos causando mayor morbilidad y mortalidad (Podschun & Ullmann, 1998).

En México, no se tienen datos exactos de la epidemiología de *K. pneumoniae*. Un estudio elaborado entre el 2005-2012 donde participaron 14 hospitales de México, correspondientes a ocho estados y cinco regiones, se identificó que la presencia de *K. pneumoniae* productora de BLEE fue del 27.5% (299/1084) (Barrios *et al.*, 2017). Otro estudio realizado entre el 2014-2015 por el Instituto Mexicano del Seguro Social, identificó a *K. pneumoniae* productora de BLEE en un 27% de los pacientes hospitalizados en el Centro Médico Nacional de Occidente en Jalisco (Sierra-Díaz *et al.*, 2019).

1.2 Patogenicidad de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae es un patógeno oportunista causante de una variedad de infecciones, como son; neumonía, infecciones en el tracto urinario, infecciones en heridas quirúrgicas y en el torrente sanguíneo, estas infecciones cada vez son más recurrentes debido al uso indiscriminado de antibióticos. En países asiáticos también se ha visto involucrada con abscesos hepáticos. Los pacientes más vulnerables a contraer una infección son los recién nacidos, los ancianos, principalmente en los que su sistema inmune se encuentra debilitado. Actualmente *K. pneumoniae* ha sido capaz de infectar no solo a personas inmunocomprometidas, sino también, a personas sanas, esto es debido a la producción elevada de polisacárido capsular. A estas cepas se les consideran hipervirulentas (hvKp) (Arato *et al.*, 2021; Choby *et al.*, 2019)

La patogenicidad de *K. pneumoniae* está dada por genes de virulencia que codifican para diversos factores de virulencia, los cuales permiten que la bacteria ataque el sistema inmunológico del hospedero. Entre estos factores se encuentran; la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), fimbrias, los sideróforos, la formación de biopelículas, las adhesinas, proteínas de membrana externa y los sistemas de adquisición de hierro (sideróforos). Siendo los primeros cuatro los que mejor se han caracterizado (fig. 1). Estos factores le permiten al patógeno sobrevivir y eludir las respuestas inmunes innatas del hospedero (Cruz-Córdova *et al.*, 2014; Davoudabadi *et al.*, 2023; B. Li *et al.*, 2014)

La cápsula es una matriz de polisacárido extracelular que envuelve a las bacterias. Las cepas hvKp producen una capa bacteriana más robusta, está constituida por exopolisacárido mucoviscoso. En las cepas clásicas se encuentran los serotipos K1 a K78; siendo los K1 y K2 los asociados a una mayor patogenicidad. Mientras que la hipercápsula de las hvKp predomina en la K1. El LPS, es un componente fundamental de la parte externa de la membrana, normalmente está compuesto por un antígeno O. Las fimbrias son mediadores indispensables para la adhesión de *K. pneumoniae*, siendo el tipo 1 y 3 las más importantes. De los sideróforos, las cepas clásicas y las hvKp producen enterobactina y yersiniabactina. En el caso de la salmoquelina y la aerobactina es poco usual que sean secretadas por cepas clásicas (Paczosa & Meccas, 2016).

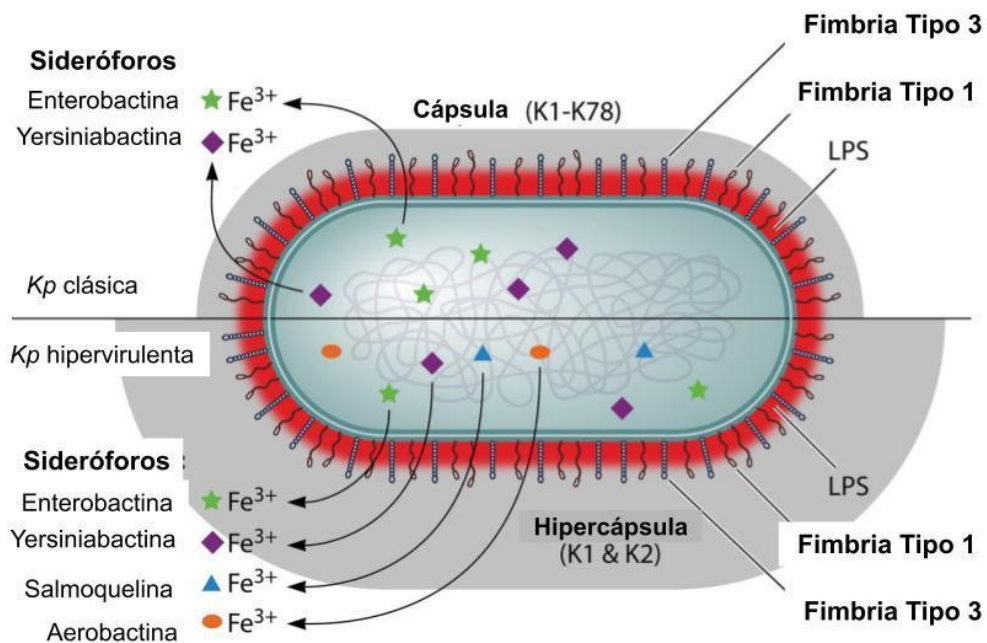


Fig. 1 Factores de virulencia caracterizados en cepas de *K. pneumoniae* clásicas e hipervirulentas. (Imagen extraída y modificada de (Paczosa & Meccas, 2016)

1.3 Mecanismos de defensa de *K. pneumoniae* contra los antimicrobianos

En los últimos años, *K. pneumoniae* se ha convertido en una de las bacterias más estudiadas, debido a su capacidad para adquirir resistencia a un gran número de antibióticos. Esto ha provocado que infecciones simples como una infección en el

tracto urinario se vuelvan graves, llevando a los pacientes incluso a la muerte. *K. pneumoniae* multirresistentes (MDR) son una de las principales causantes de enfermedades nosocomiales. *K. pneumoniae* tiene la capacidad de producir β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas, los cuales son causantes de altas tasas de mortalidad, entre 40 y 50% (Hafiz et al., 2023). La expresión de BLEE provoca que las bacterias sean resistentes a cefalosporinas y monobactámicos, por otro lado, la expresión de carbapenémicos causa que las bacterias sean resistentes a la mayoría de los β -lactámicos disponibles, incluidos los carbapenémicos (Paczosa & Meccas, 2016).

Comprender los mecanismos de resistencia empleados por las bacterias contra los antimicrobianos puede ayudar a desarrollar métodos más eficaces para combatirlos. Desde el punto de vista evolutivo, las bacterias utilizan dos mecanismos para contrarrestar a los antibióticos, la mutación de genes y la obtención de DNA externo mediante transferencia horizontal de genes (TGH). En el primer mecanismo, la actividad del fármaco es afectada debido a que un subconjunto de bacterias susceptibles desarrolla mutaciones que influyen en su función. El antibiótico es capaz de eliminar a las bacterias susceptibles mientras que las resistentes sobreviven (Munita & Arias, 2016). Para realizar lo antes mencionado las bacterias utilizan los siguientes mecanismos: modificaciones del objetivo, bombas de eflujo y difusiones limitadas (Zhou *et al.*, 2015).

En la transferencia horizontal de genes las estrategias utilizadas por las bacterias son, la transformación (incorporan DNA desnudo), transducción (mediada por fagos) y la conjugación (célula donadora-célula receptora). En la conjugación, para compartir la información genética se utilizan elementos genéticos móviles (MGEs), entre los más importantes están los plásmidos y los transposones (Munita & Arias, 2016).

Sin embargo, uno de los nuevos mecanismos estudiados que ayuda tanto a la supervivencia de la bacteria como a la transferencia horizontal de genes son la secreción de microvesículas de membrana externa (OMV's).

1.4 Microvesículas de membrana externa (OMV's)

Las microvesículas de membrana externa, OMV's por sus siglas en inglés, son estructuras esféricas de tamaño nanométrico secretadas principalmente por bacterias Gram-negativas. Estas estructuras contienen lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, ADN, ARN, así como proteínas localizadas en el citoplasma, la membrana interna (IM), el periplasma y la membrana externa (OM) (fig. 2) (Bonnington & Kuehn, 2014). Las OMV's tienen un papel multifacético en la interacción del microorganismo-hospedero, microorganismo-medio ambiente como son; la adquisición de nutrientes, la respuesta al estrés, en la neutralización de péptidos antimicrobianos que otorgan resistencia a los antibióticos, en la formación de biopelículas, factores de adhesión y virulencia, reducción de compuestos tóxicos y en la evasión del sistema de defensa del hospedero (Dell'Annunziata *et al.*, 2021; Furuyama & Sircili, 2021).

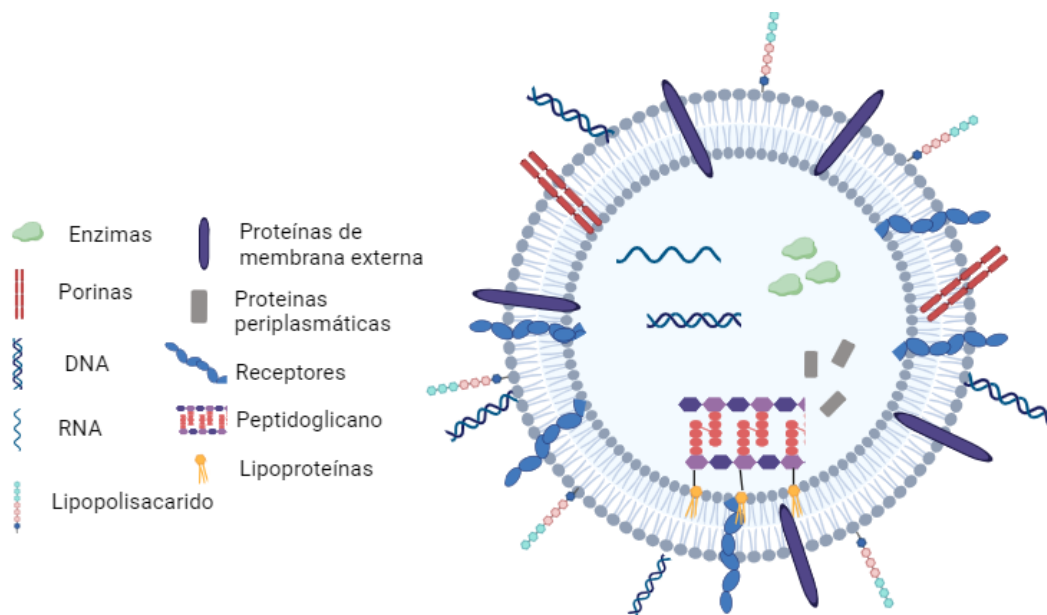


Fig.2 Estructura de las microvesículas de membrana externa. Autoría propia, elaborado en BioRender.com

1.4.1 Biogénesis

La microvesiculación generalmente varía entre especies o cepas. Su regulación depende de diversos factores como son la temperatura, la patogenicidad, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de antibióticos (Furuyama & Sircili, 2021; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

La biogénesis de las OMV's ha sido una incógnita desde que se comenzó su estudio, en los últimos años se ha presentado un incremento en el interés de conocer cómo se producen. Regularmente, la formación de las OMV's comienza con el abultamiento de la membrana externa (OM) y finaliza con la liberación de la OMV en el medio (Fig. 3) (Magaña *et al.*, 2023).

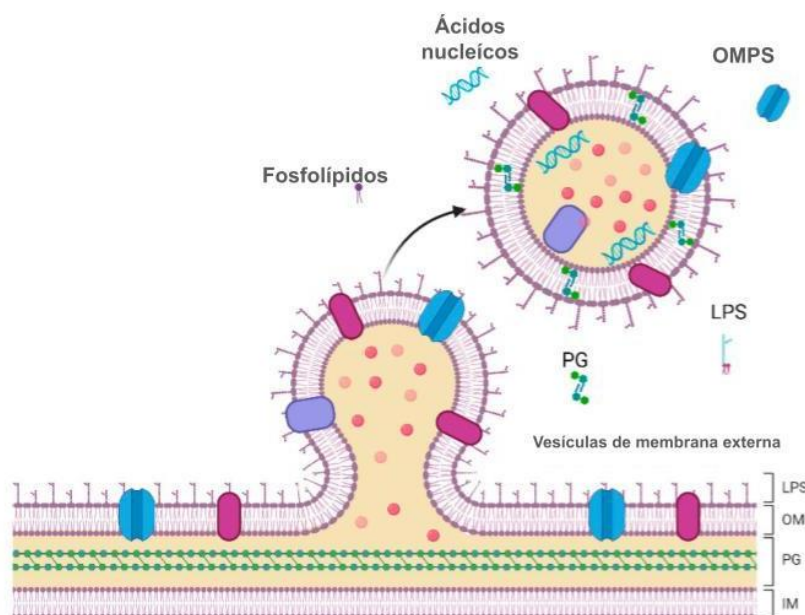


Fig. 3 Representación de la formación y liberación de las OMV's. Extraído de Giseth Magaña, 2023

Inicialmente se consideró que su formación era un proceso físico producido por un desgaste natural de la membrana externa (OM) (Kulkarni & Jagannadham, 2014). Aunque algunas personas aún conservan esta hipótesis, en el transcurso de los años ha habido estudios donde se proponen diversos modelos para la formación de las OMV's. Uno de los modelos sugiere que la producción de las OMV's es dada por la ausencia de las proteínas que unen a la OM con la capa de peptidoglicano. Esto podría suceder si se adiciona algún antibiótico que dañe el peptidoglicano,

resultando en la liberación de OMV's con fragmentos de peptidoglicano integrados (Kulp & Kuehn, 2010). También se ha sugerido que la producción de OMV's no solo está relacionada con proteínas que generan curvatura en la OM. Las diversas proteínas pueden provocar una flexión de la membrana debido a la acumulación en la periferia celular, con la presión lateral producida por la interacción proteína-proteína provoca la liberación de OMV's (Tricarico *et al.*, 2017).

La formación de enlaces cruzados entre la lipoproteína de Braun (Lpp) y el peptidoglicano (PG), se da debido a las enzimas que participan en la regularización de síntesis y descomposición del PG. Cuando se forman áreas de enlaces cruzados Lpp-PG reducidos provoca que las OMV's se desarrollen dentro de estas áreas. Otro mecanismo planteado para la hipervesiculación es el aumento de señalización de quinolona de *Pseudomonas* (PQS) en la parte externa de la membrana, esto provoca que la curvatura aumente y conduce a la producción de OMV's (Schwechheimer & Kuehn, 2015).

1.4.2 Patogénesis mediada por OMV's

Desde el descubrimiento de las microvesículas de membrana externa, se han estudiado sus diversas funciones, una de las principales para la investigación es su implementación y favorecimiento en la patogénesis. Se han vinculado a las OMV's con la patogénesis debido a la capacidad que estas tienen para acceder a las células epiteliales y macrófagos, esto provoca una respuesta instantánea del sistema inmune innato, originando una inflamación (Magaña *et al.*, 2023).

En diversos estudios se ha visto la capacidad de las microvesículas de transportar factores de virulencia (la invasión, la resistencia a los antimicrobianos, adherencia y la modulación de la inmunidad del hospedero a larga distancia, promoviendo la colonización del hospedero) (Ellis & Kuehn, 2010; Gilmore *et al.*, 2021; Sartorio *et al.*, 2021). Bomberger y colaboradores en 2009 demostraron que las OMV de *Pseudomonas aeruginosa* eran capaces de traslocar proteínas de la bacteria al citoplasma de la célula hospedera, protegiéndolas de ser degradadas por proteasas. En este estudio se identificó que la entrega de factores de virulencia

podría ocurrir en ausencia de bacterias, dejando a un lado la interacción directa entre el patógeno y la célula hospedera (Bomberger *et al.*, 2009)

Las OMV's contienen un cargo inmunoestimulador de sus bacterias de origen, estas son denominadas patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP), incluyen moléculas como LPS, PG y ácidos nucleicos. La detección de los MAMP está dada por receptores de reconocimiento de patógenos inmunes innatos (PRR) del hospedero. Los PRR activan vías de señalización, provocando una respuesta inmune mediada por citoquinas inflamatorias, además prepara la respuesta inmune adaptativa del antígeno. Estas respuestas son indispensables para que el microorganismo sea eliminado (Gilmore *et al.*, 2021; Kawasaki & Kawai, 2014). Entre algunos de los PRR mejor caracterizados se encuentran los receptores transmembrana tipo Toll (TLR), los TLR tienen un papel clave en la identificación de las OMV's debido a que se han relacionado con el reconocimiento de LPS, PG y ácidos nucleicos (Magaña *et al.*, 2023.)

1.4.3 Resistencia a los antibióticos mediada por las OMV's

La resistencia a los antibióticos ha sido un problema mundial que ha incrementado con el paso de los años, reconocer los mecanismos de resistencia que implementan las bacterias puede ayudar a desarrollar nuevos enfoques antibacterianos. Se ha reconocido que las OMV's pueden desempeñar un papel fundamental en la resistencia a los antibióticos (fig. 4) (Uddin *et al.*, 2020). Las OMV's pueden intervenir de distintas maneras; interactuar como señuelos y adsorber los fármacos antimicrobianos, permitiendo que las bacterias sobrevivan a dosis letales. Esto es importante para las bacterias que fueron tratadas con daptomicina y las polimixinas (Dhital *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022).

Las microvesículas producidas pueden transportar enzimas que degradan antibióticos, promoviendo la resistencia a estos. En el estudio de Devos S y colaboradores en el 2016 se observa que *Stenotrophomonas maltophilia* al estar expuesta a penicilina (1 mg/ml), secretaron microvesículas que contenían β -lactamasas. Cuando se añadieron las OMV's a los extractos de *S. maltophilia*, las

concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) aumentaron de 500 µg/ml a 2500 µg/ml en el caso de imipenem y de 250 µg/ml a 2500 µg/ml para ticarcilina. *P. aeruginosa* y *B. cenocepacia* mostraron una resistencia similar al estar en contacto con las OMV's de *S. maltophilia*. Esto sugiere que las OMV's que contienen β-lactamasas protegen no solo a *S. maltophilia*, sino también a *P. aeruginosa* y *B. cenocepacia* contra antibióticos β- lactámicos (Devos *et al.*, 2016).

Otro mecanismo es la transferencia horizontal de genes (HTG) de resistencia a los antimicrobianos, las bacterias susceptibles a los antibióticos pueden adquirir genes de resistencia utilizando a las OMV's como portadores, esto se da sin importar la especie. Las vesículas ayudan a la propagación de resistencia entre las poblaciones bacterianas (Magaña *et al.*, 2023). Las OMV's pueden intervenir en la resistencia a los carbapenémicos mediante la inhibición de la permeabilidad de la membrana, bombas de eflujo, enzimas inactivadoras de fármacos y cambios en los blancos de los fármacos (Furuyama & Sircili, 2021). Se han tenido informes de la HGT en *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter baylyi*, *Porphyromonas gingivalis*, *P. aeruginosa* y *Thermus thermophilus* (P. Li *et al.*, 2022).

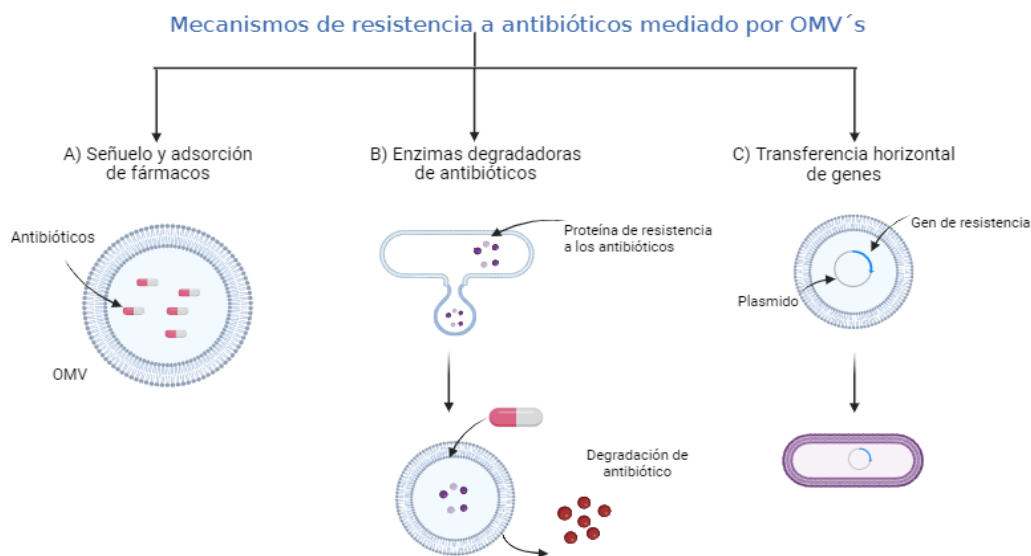


Fig.4 Mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por las microvesículas de membrana externa. A) Adsorción del antibiótico. B) Las enzimas degradan al antibiótico, C) Transferencia de genes mediada por las microvesículas. Imagen extraída de (Liu *et al.*, 2022), modificada en Biorender.com

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes generales

En la actualidad, el incremento de la propagación de bacterias multirresistentes (MDR), ha aumentado preocupantemente en el número de decesos, sobre todo en países en desarrollo. El grupo ESKAPE son considerados entre los principales patógenos de interés debido al potencial que estos cuentan para escapar o evadir la acción de agentes antimicrobianos. Siendo *K. pneumoniae* una de las especies reconocidas, debido a la cualidad que presenta, para resistir a múltiples fármacos, incluso los de última línea, como son: la colistina, la tigeciclina y los carbapenémicos (Ballén *et al.*, 2021; Salawudeen *et al.*, 2023). La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye a *K. pneumoniae* como una especie de alta prioridad debido al peligro que presenta en hospitales y señala la importancia de desarrollar nuevos tratamientos eficaces (World, 2017).

Shiri Navon-Venezia y colaboradores, realizaron un estudio estadístico entre el 2005-2015 donde se muestra un incremento en la tasa de resistencia de *K. pneumoniae* contra las cuatro clases principales de antibióticos; cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y los carbapenémicos. En el año 2005 la mayoría de los países que componen la Unión Europea eran libres de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos, 10 años más tarde, países como Rumanía, Italia y Grecia, presentaron tasas de resistencia entre el 40%-60% (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

En Latinoamérica el surgimiento de las cepas de *K. pneumoniae* resistentes tuvieron comportamiento similar a las de la Unión Europea. En Ecuador, en el año 2000 las enfermedades causadas por esta bacteria eran poco comunes, para el año 2010 ya se habían reportado casos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) tipo 2. Posteriormente, en el año 2016 se identificó el primer caso de la enzima metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM-1) en un paciente seropositivo (Herrera Dután *et al.*, 2021).

En el año 2013 se presentó el primer caso de *K. pneumoniae* productora de KPC en un paciente diagnosticado con lupus eritematoso en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza, Lima, Perú. La cepa productora de NDM-1 se identificó a través de tipificación molecular el año 2016 en el Hospital Nacional Dos de Mayo de Perú (Herrera Dután *et al.*, 2021).

En México, se describió en el año 2001 a *K. pneumoniae* como un patógeno productor de BLEE importante en las infecciones pediátricas. Entre el 2004 y el 2008 se detectó la presencia de bacteriemias e infecciones urinarias en diversos hospitales de México, estas causadas por *K. pneumoniae* productoras de las enzimas β -lactamasas SHV-5 y TLA-1 (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2013).

2.2 Antecedentes específicos

En Puebla, se han identificado diversas cepas de *K. pneumoniae*, estas fueron aisladas de 3 hospitales; Hospital para el Niño Poblano, Hospital de la mujer y el Hospital 20 de noviembre. Hasta el 2008 se habían aislado 34 cepas resistentes a diversos antibióticos. Entre estas cepas se encontraban las 172, 229, 260 y 321.

Las cepas 172, 229 y 260 fueron aisladas del Hospital de la Mujer, las 3 cepas mostraron resistencia a diversos antibióticos, la cepa 321 se aisló del hospital para el Niño Poblano. Las cepas 172 y 229 presentaron resistencia a antibióticos de la familia de los β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas. La cepa 260 fue resistente a β -lactámicos, aminoglucósidos, y quinolonas. Los antibióticos a los cuales presentaron resistencia y sensibilidad se encuentran en el anexo, N1 (Díaz L, 2008).

3. Justificación

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista que ha tomado gran relevancia debido al incremento de infecciones y a la carencia de tratamientos efectivos. *K. pneumoniae* ha adquirido nuevos mecanismos de resistencia, aumentando preocupantemente su resistencia a diversos antimicrobianos. Según datos de la OMS, *K. pneumoniae* presenta entre el 4,1% y 79,4% de resistencia a

ciprofloxacino, un antibiótico habitualmente utilizado en infecciones urinarias. Esto ha provocado un mayor uso de antibióticos de último recurso, como los carbapenémicos, cuya eficiencia ya se ve comprometida en diversos países, aumentando el número de infecciones que ya no pueden ser tratadas (World, 2023). La identificación de los nuevos mecanismos de resistencia implementados por las bacterias es relevante para el desarrollo de nuevas terapias. Se han realizado estudios sobre las microvesículas de membrana externa y cómo estas ayudan al patógeno a sobrevivir a concentraciones letales de antibióticos. Este estudio tiene como propósito comprender el papel que desempeñan las OMV's secretadas por *K. pneumoniae*, conocer sus implicaciones en la supervivencia de la bacteria y su funcionamiento como posible mecanismo de transferencia horizontal de genes.

4. Hipótesis

Las microvesículas de membrana externa secretadas por *Klebsiella pneumoniae* son capaces de transferir genes de resistencia a betalactámicos a bacterias susceptibles.

5. Objetivo general

Purificar OMV's secretadas por *Klebsiella pneumoniae* y analizar la capacidad de estas para transferir genes de resistencia.

6. Objetivos particulares

1. Sobreexpresar y purificar OMV's a partir de cuatro aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* a través de centrifugación diferencial y filtración por membrana de nylon.
2. Analizar el perfil de transferencia de genes asociadas a las OMV's posterior al tratamiento con DNasa y Proteinasa K.

3. Obtener el DNA genómico a partir de *E. coli* DH5 α transformada con las OMV's y buscar mediante PCR genes de resistencia a Betalactamasas de Espectro extendido (BLEE).
4. Identificar la presencia de proteínas totales y enolasa en el exterior en las OMVs purificadas mediante inmunofluorescencia indirecta.

7. Materiales y métodos

7.1 Resembrado de cepas de aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *E. coli*

Se emplearon cuatro cepas de *Klebsiella pneumoniae*: KpBUAP172, KpBUAP229, KpBUAP260 y KpBUAP321, las cuales se encontraban preservadas mediante congelación a -80 °C. Cada cepa fue recuperada a partir de un medio LB con glicerol al 20%, sembrándose mediante estría cruzada en placas con agar Luria-Bertani (LB), se etiquetaron y se dejaron incubando a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de recuperación, a partir de este crecimiento se llevó a cabo la expresión de microvesículas.

La cepa de *E. coli* utilizada fue la DH5 α , la cual es una cepa de referencia y es óptima para procesos de transformación, a partir de un criovial se cultivó en placas con medio LB para su recuperación. Posteriormente se tomó una asada y se resembró por estría cruzada en una placa con el mismo medio, se etiquetaron y se encubaron a temperatura ambiente por 24 hrs.

7.2 Expresión de OMV's

La expresión de microvesículas se realizó según el protocolo elaborado por Guerra Martínez en el 2022. La expresión se llevó a cabo bajo condiciones de estrés por antibiótico. Brevemente, se tomó una asada de cada cepa de *K. pneumoniae* y se sembraron en matraces con 250 ml de medio LB. Se adicionaron 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ampicilina y se dejaron en incubación durante 48 horas a 37 °C con agitación a 120 rpm (Guerra Martínez, 2022).

7.3 Purificación de OMV's mediante centrifugación diferencial y membranas de nylon.

Posterior a la inducción de las OMV's, a cada medio de cultivo se le realizaron una serie de ultracentrifugaciones a 6000 RPM, 4 °C durante 40 minutos (centrífuga refrigerada CENTURION®). Posterior a esto, el sobrenadante fue filtrado a través de membranas de nylon (Durapore) usando poros de 0.40 y 0.22 micrómetros. Se adicionó acetona fría (JT Baker) en una proporción 2:1 para la precipitación y se mantuvo a 4 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo una segunda ultracentrifugación durante 15 minutos a 6000 RPM a 4 °C; se desechó el sobrenadante y con PBS estéril se recuperó la pastilla conteniendo a las OMV's. Finalmente, se realizó una última centrifugación con el equipo WiseSpin a 13000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 500 µl de PBS estéril y se resguardo a -20 °C hasta su uso.

7.4 Tinción de Gram modificada

Una vez purificadas las OMV's, se realizó una tinción de Gram a las microvesículas purificadas a partir de las 4 cepas de *K. pneumoniae*.

Debido al grosor de la membrana de las OMV's se decidió modificar la tinción tradicional aumentando el tiempo al doble en cada uno de los pasos (fig. 5)

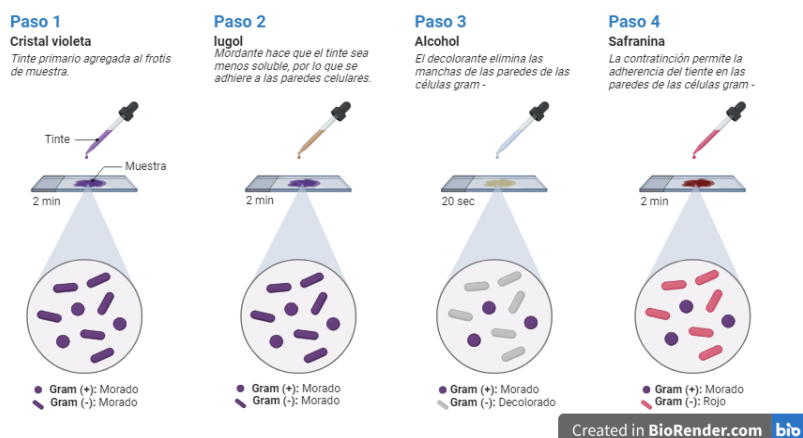


Fig. 5 Protocolo de tinción de gram modificado. Imagen elaborada en BioRender.com

7.5 Determinación de la concentración de las OMV's de *K. pneumoniae*

Para determinar la concentración de OMV's purificadas, de manera indirecta, se realizó una cuantificación de proteínas usando el método de Bradford, se utilizó el reactivo Bradford Reagent de SIGMA acorde a las instrucciones del proveedor, se adicionaron los volúmenes señalados en la tabla 1

Tabla 1. Volumen adicionado en cada pocillo para la cuantificación de las OMV's

Pozo	VOL BSA (μL)	VOLUMEN PBS (μL)	VOLUMEN FINAL (μL)	BRADFORD (μL)	μG/ML
1	0	200	200	50	0
2	20	180	200	50	10
3	40	160	200	50	20
4	60	140	200	50	30
5	80	120	200	50	40
6	100	100	200	50	50
7	120	80	200	50	60
8	140	60	200	50	70
9	160	40	200	50	80
10	180	20	200	50	90
11	200	0	200	50	100

Una vez hecha la curva, se utilizaron 5 μl de OMV's con 195 μl de PBS.

7.6 Ensayo de protección a una cepa susceptible de *Escherichia coli*

Una vez conocida la concentración de OMV's purificadas para cada cepa, se ajustó el volumen necesario para obtener una concentración final de 50 µg de OMV's.

A las OMV's se les aplicaron dos tratamientos: en el primer tratamiento, se dejaron interactuando con 2 µL de Proteínasa K durante una hora a temperatura ambiente. En el segundo tratamiento, se les añadieron 2 µL de DNAsa y 2 µL de buffer; se dejaron incubar durante una hora a 37 °C. Después de este tiempo, se adicionaron 2 µL de EDTA y se permitió la interacción durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se realizaron dos tipos de ensayo en tubo y placa;

- **Ensayo en tubos:**

Por cepa se adicionaron OMV's sin tratamiento, OMV's con DNAsa y OMV's con Proteínasa K en tubos distintos (5 ml de medio LB), estas se dejaron interactuar con 100 µg/ µl de ampicilina durante 4 horas a temperatura ambiente (RT por sus siglas en inglés), una vez pasadas las 4 horas se adicionaron 100 µl de *E. coli* DH5α y se incubaron por 48 horas a 37°C en agitación a 120 rpm.

- **Ensayo en placas.**

Al igual que en el ensayo en tubos; se adicionaron OMV's sin tratamiento, OMV's con DNAsa y OMV's con proteínasa K en tubos distintos (5 ml de medio LB). Posteriormente se adicionaron 100 µl de *E. coli* DH5α y se incubaron durante 4 horas a RT. Pasadas las 4 horas se tomaron 100 µl de cada medio y se sembraron en placas con ampicilina, se dejaron en incubación toda la noche a 37°C para su posterior revisión.

7.7 Cuantificación del crecimiento de *E. coli*

La cuantificación se realizó a partir de los ensayos en tubos.

Se realizaron los tratamientos con Proteínasa K y DNAsa como anteriormente se menciona. Las OMV's se adicionaron a tubos con 5 ml de medio LB y 100 µg/µl de

ampicilina durante 4 horas a RT, una vez pasadas las 4 horas se añadieron 100 μ l de una suspensión de *E. coli* DH5 α al 0.5 en la escala de MacFarland y se incubaron por 24 horas.

Pasadas las 24 horas se cuantificaron mediante un espectrofotómetro (Thermo scientific) el crecimiento que tuvo *E. coli* DH5 α al estar en incubación con las OMV's sin tratamiento, tratadas con proteinasa K y con DNAsa. La cuantificación se realizó a una DO de 600 nm, el control negativo utilizado fue el contenido del tubo con medio LB/Antibiótico/*E. coli* DH5 α .

7.8 Inmunofluorescencia indirecta en OMV's y en bacterias de *K. pneumoniae*

Se tomaron alícuotas de 10 μ l de OMVs y 10 μ l de *K. pneumoniae* suspendida en medio líquido. Cada alícuota se añadió a portaobjetos limpios, seguido de la adición de 20 μ l de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich), permitiendo la interacción durante 30 minutos. Después del proceso de fijación de las OMVs y de las bacterias, se realizaron 3 lavados con PBS. Se procedió a clarificar con cloruro de amonio (Merck Millipore) durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de nuevos lavados. Este procedimiento fue realizado por duplicado para posteriormente permeabilizar y bloquear las muestras.

Las muestras bloqueadas fueron incubadas con BSA al 2% a temperatura ambiente durante una hora. Las muestras permeabilizadas fueron incubadas con BSA al 2% y Triton X-100 al 0.5% durante una hora a 37°C. Posteriormente, se realizaron nuevamente lavados con PBS.

Se tomaron dos portaobjetos; uno que contenía la muestra bloqueada de OMVs y otro con *K. pneumoniae* bloqueada. A cada portaobjetos se le adicionó el primer anticuerpo anti-OMVsKp hechos en ratón a una dilución de 1/1000, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Este procedimiento se repitió también usando el anticuerpo anti-Hienolasa como primer anticuerpo. Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS y se añadió el segundo anticuerpo anti-mouse IgG acoplado a

FITC (dilución 1/500) durante 2 horas a 37°C en completa oscuridad. Después de este tiempo, se realizaron lavados con PBS y se montó la muestra con 7 µl de Vectashield® Antifade Mounting Medium with DAPI (H-1200-10) de Vectro Laboratories. Se cubrió la preparación con un cubreobjetos limpio y se selló con barniz transparente.

7.8.1 Inmunofluorescencia indirecta con tratamientos de DNAsa o Proteinasa K

Se tomaron 10 µl de OMV's y 10 µl de las bacterias suspendidas, se adicionaron en un tubo eppendorf estéril, esto se realizó 4 veces. Dos tubos fueron tratados con DNAsa; se adicionaron 2 µl de DNAsa y 2 µl buffer, se incubaron a 37°C durante una hora, posteriormente se añadieron 2 µl de EDTA. Los otros dos tubos fueron tratados con Proteinasa K; se añadieron 2 µl de esta en cada tubo y se dejaron interaccionando durante 1 hora a temperatura ambiente. Posterior a este tratamiento, se realizó la inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente.

7.9 Antibiogramas en *E. coli* recuperadas del ensayo de protección

Una vez que las bacterias crecieron de manera adecuada, se realizó una suspensión bacteriana al 0.5 en la escala de MacFarlan (1×10^8 UFC) y se inocularon de manera masiva, con un hisopo estéril en placas de medio Muller-Hinton (BD Bioxon). Se depositaron antibiogramas (INVESTIGACIÓN DIAGNOSTICA) con una concentración conocida de antibiótico (tabla 2) y se dejó en incubación durante 24 hrs a 37°C, posteriormente se realizó la lectura de los halos de inhibición acorde al CLSI 2023.

Tabla 2. Concentraciones de antibióticos implementados en el antibiograma.

Clave	Antibiótico	Concentración	Clave	Antibiótico	Concentración
AK	Amikacina	30 µg	DC	Dicloxacilina	1 µg
AM	Ampicilina	10 µg	ENX	Enoxacina	10 µg
CB	Carbenicilina	100 µg	E	Eritromicina	15 µg

<i>CF</i>	Cefalotina	30 µg	GE	Gentamicina	10 µg
<i>CFX</i>	Cefotaxima	30 µg	NET	Netilmicina	30 µg
<i>CTZ</i>	Ceftazidima	30 µg	NF	Nitrofurantoína	300 µg
<i>CTX</i>	Ceftriaxona	30 µg	NOF	Norfloxacino	10 µg
<i>CXM</i>	Cefuroxima	30 µg	P	Penicilina	10 U
<i>CPF</i>	Ciprofloxacino	5 µg	SXT	Sulfametoxazol/ Trimetoprim	25 µg
<i>CLM</i>	Clindamicina	30 µg	TE	Tetraciclina	30 µg
<i>CL</i>	Cloranfenicol	30 µg	VA	Vancomicina	30 µg

7.10 Extracción de DNA genómico de *E. coli* recuperada de los ensayos de protección con OMV's

Mediante centrifugaciones (13000 rpm 3 minutos), se empastillaron las bacterias que crecieron en los tubos. Posteriormente se le adicionaron 250 µl de buffer de lisis y 2 µl de lisozima, se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Pasado el tiempo se añadieron 400 µl de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (Golden Bell), y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 2 volúmenes de cloroformo- isoamílico (24:1), se mezcló en vórtex y se centrifugó una vez más a 13,000 rpm durante 10 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y este fue precipitado con 200 µl de isopropanol (J.T.Baker) frío, se incubó a 4°C durante 15 minutos. Se realizó una última centrifugación a 13,000 rpm durante 15 minutos y se recuperó la pastilla, la cual fue lavada con 1 ml de etanol (J.T.Baker) al 70%, una vez seca la pastilla se resuspendió con 50 µl de PBS estéril y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

7.11 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En un tubo eppendorf se añadieron 12.5 µl de Dream Taq Green mix (Thermo Scientific™), 2 µl de DNA, 1 µl de cada oligo (reverse y forward) y 8.5 µl de agua, se amplificaron en un termociclador (Bio-Rad T100 Thermal-cycler) bajo las condiciones de la tabla 3. Los genes amplificados correspondientes a BlaTEM y

BlaKPC, así como las secuencias de los oligonucleótidos usados se encuentran en la tabla 4.

Tabla 3. Condiciones del termociclador para PCR utilizados para amplificar los diversos genes.

Pasos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	2:00 minutos
Desnaturalización, fusión y extensión por 30 ciclos	95 °C	30 segundos
	52-58°C	1:00 minuto
	72 °C	1:00 minuto
Extensión final	72 °C	10 minutos
Mantenimiento	12°C	

*En el paso de la temperatura de alineamiento (fusión) los rangos de temperatura se realizaron en gradiente con el fin de determinar la temperatura adecuada.

Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos

Nombre del gen	Tamaño del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5´-3´)
bla_{TEM}	526	TEM-F	TTATCCGCCTCCATCCAGTC
		TEM-R	TGGGTGCACGAGTGGGTTAC
bla_{KPC}	882	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT
		KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCC A

* F: Forward; R: Reverse; TEM: temoniera; KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa

Los amplicones fueron migrados en una electroforesis de gel de agarosa al 1% en buffer TAE (1X) teñido con bromuro de etidio (Bio-rad). Para verificar el tamaño del DNA amplificado, se utilizó el marcador de peso molecular (MaestroGen). La electroforesis se realizó con una carga eléctrica de 100 voltios durante 40 minutos.

8. Resultados

8.1 Expresión de OMV's

Con la finalidad de evaluar la capacidad de las cepas de *K. pneumoniae* para producir microvesículas, se generó un estrés mediante antibiótico, en este caso, ampicilina. Después del período de expresión y purificación de las OMV's, se revisó la secreción mediante tinciones de Gram modificadas (figura 6). Se observan morfologías esféricas con una coloración púrpura.

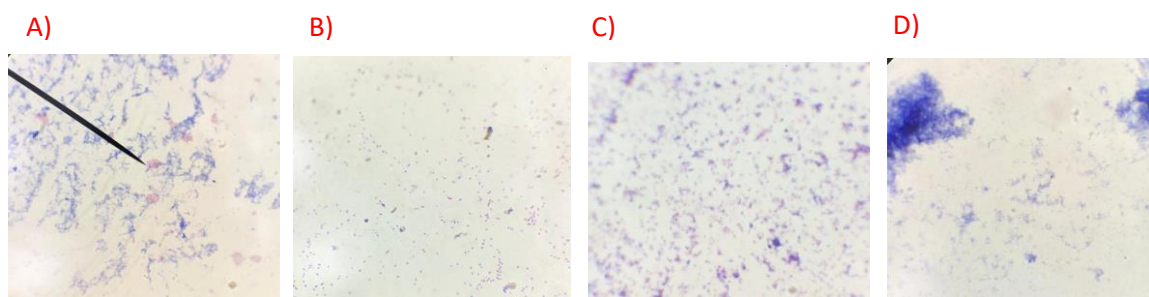


Figura 6. Tinción de Gram modificada (100 X) para la observación de las OMV's después de las 48 horas de incubación, A) *K. pneumoniae* 172; B) *K. pneumoniae* 229; C) *K. pneumoniae* 260; D) *K. pneumoniae* 321.

8.2 Cuantificación de OMV's

Al verificar la expresión de las OMVs, se procedió a cuantificarlas. Después de realizar la curva, como se indica en la tabla 1, se tomó 5 μ l de muestra de cada cepa y se añadieron a 195 μ l de PBS estéril. La placa fue leída a 630 nm en un microlector de placas (Accuris SmartReader™ 96 Microplate Absorbance Reader). Las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla 5

Tabla 5. Concentraciones obtenidas de las OMV's en 5 μ l

Cepa	Concentración (ug/ml)
KPN 172	20.70
KPN 229	18.48
KPN 260	3.541

8.3 Ensayo de protección

Se considera que las OMV's pueden ser otro mecanismo de transferencia horizontal de genes; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual las microvesículas se comunican con las bacterias. Se planteó la hipótesis de que las OMVs pueden contener proteínas y ADN externo, lo cual es fundamental en la comunicación con las bacterias. Para explorar esto, se trataron las OMVs de cada cepa con Proteinasa K y DNAsa con el fin de conocer los cambios que provocarían en el crecimiento de la cepa susceptible. Se llevaron a cabo dos ensayos, uno en tubos y otro en placa, con modificaciones específicas en cada uno.

En los ensayos en tubos, se incubaron las OMVs con ampicilina y luego se añadieron 100 µl de *E. coli*. En los ensayos en placa, las OMVs se dejaron interactuar con las bacterias y posteriormente se sembraron en placas con LB y ampicilina. Ambos ensayos se incubaron a 37°C. Las placas fueron revisadas después de 22 horas para verificar el crecimiento de *E. coli*. En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos, considerando el 100% en presencia de al menos una colonia de bacterias en la placa y 0% en caso de ausencia de crecimiento. Una vez que las bacterias crecieron, se resembraron en tubos con medio LB y ampicilina a una concentración letal, y se incubaron durante 48 horas. Posteriormente, a estos tubos se les realizaron pruebas de antibiogramas.

Tabla 6. Crecimiento de *E coli DH5α* en placas. A las 22 horas de revisión de las placas se notó la diferencia de crecimiento entre las OMVs tratadas con Proteinasa K, con DNAsa y las que no fueron tratadas. A pesar de las diferencias entre el número de colonias y el tamaño de estas, las únicas que no tuvieron crecimiento fueron las de *E coli* tratadas con OMVs de KPN 172 solas y con DNAsa. **NP: No Presentó Crecimiento. PC: Presentó Crecimiento.**

Cepas	Sin tratamiento	Tratadas con DNAsa	Tratadas con PK
-------	-----------------	-----------------------	-----------------

172	NP	NP	PC
229	PC	PC	PC
260	PC	PC	PC
321	PC	PC	PC

8.4 Monitoreo del crecimiento de *E. coli* DH5 α

Se monitoreó el crecimiento de *E. coli* DH5 α en los ensayos en tubo, y la cuantificación se realizó después de 24 horas de la incubación de *E. coli* DH5 α con las OMV's tratadas con DNAsa, proteinasa K y sin tratamiento. La cuantificación se llevó a cabo con un espectrofotómetro a una DO 600 nm. Los datos recolectados se presentan en la tabla 6 y la figura 7. Se observa que, en la mayoría de los casos, la bacteria presentó un mayor crecimiento al estar en contacto con las OMV's tratadas con DNAsa. Se realizó un análisis Tukey con el programa Minitab (figura 8) para determinar si existía alguna diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

Con los datos obtenidos se realizó un modelo sugerido entre las interacciones de las OMV's con tratamiento y las bacterias (figura 10).

Tabla 7. Monitoreo del crecimiento de *E. coli* DH5 α . Se monitoreó el crecimiento de *E. coli* al estar en contacto con las OMV's de las 4 cepas de *Klebsiella pneumoniae* durante 24 hrs.

Cepa	OMV's sin tratamiento	OMV's tratadas con DNAsa	OMV's tratadas con Proteinasa K
KPN 172	1.184	1.145	1.135
KPN 229	0.670	0.760	0.150
KPN 260	0.925	1.225	0.846
KPN 321	1.188	1.223	0.176

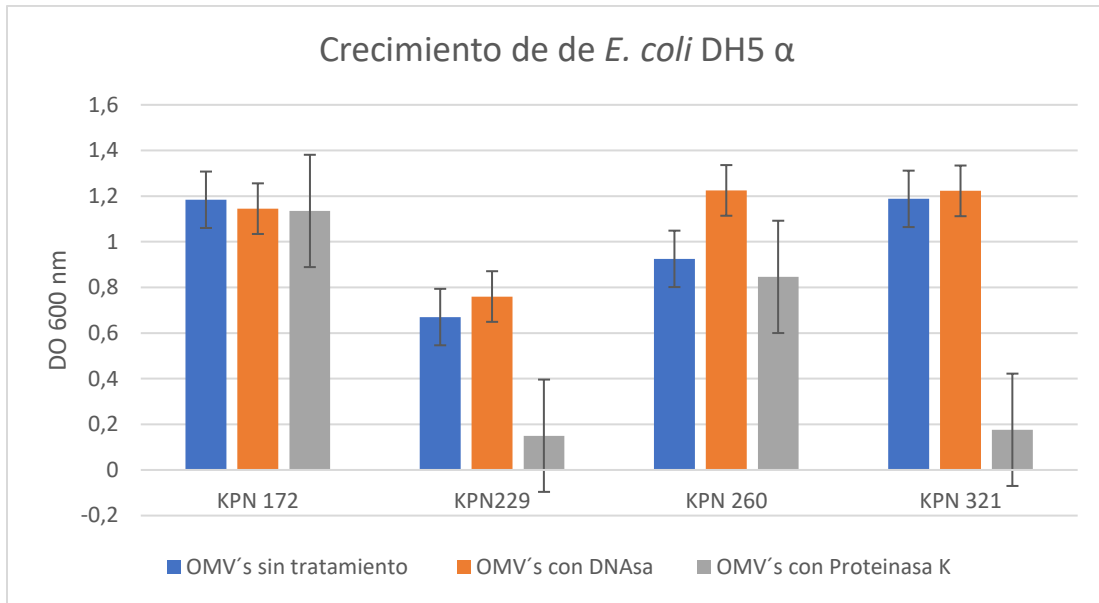


Figura 7. Cuantificación del crecimiento de *E. Coli* Monitoreo del crecimiento de *E. coli* a las 24 horas, después del tratamiento con microvesículas, OMV's con proteinasa K y OMV's con DNAsa. Las gráficas demuestran el promedio de 3 ensayos independientes, \pm la desviación estándar.

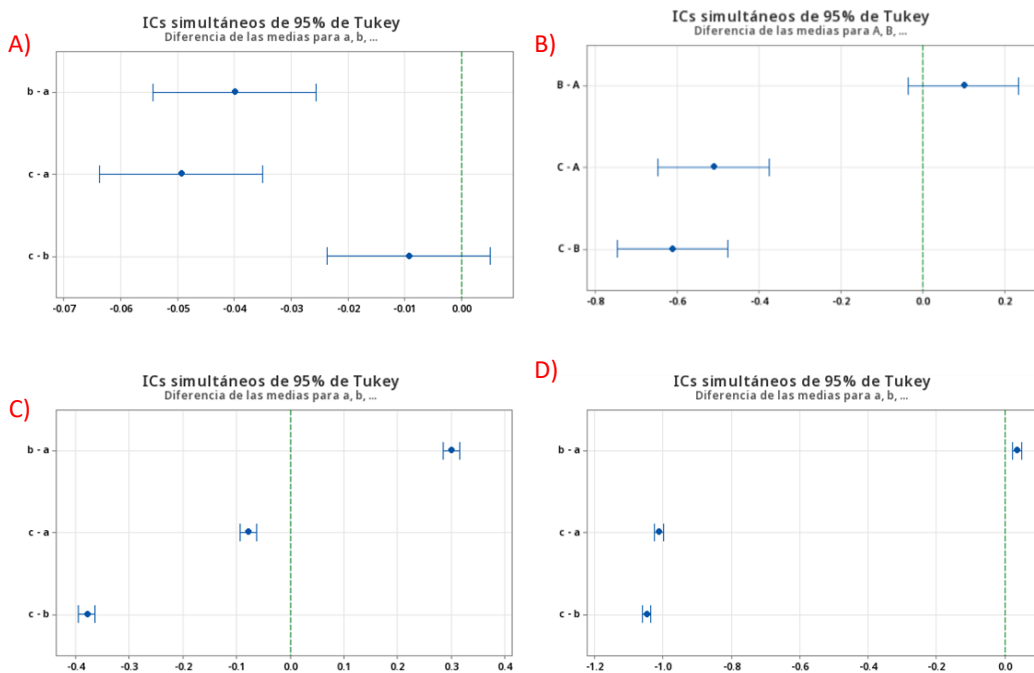


Figura 8. Análisis Tukey. Si un intervalo no contiene el valor de 0, las correspondientes medias son significativamente diferentes. El proceso "a" hace referencia a las OMVs sin tratamiento, el proceso "b" las OMVs tratadas con DNAsa y el proceso "c" las OMVs tratadas con Proteinasas K. A) KPN 172. B) KPN 229. C) KPN 260. D) KPN 321

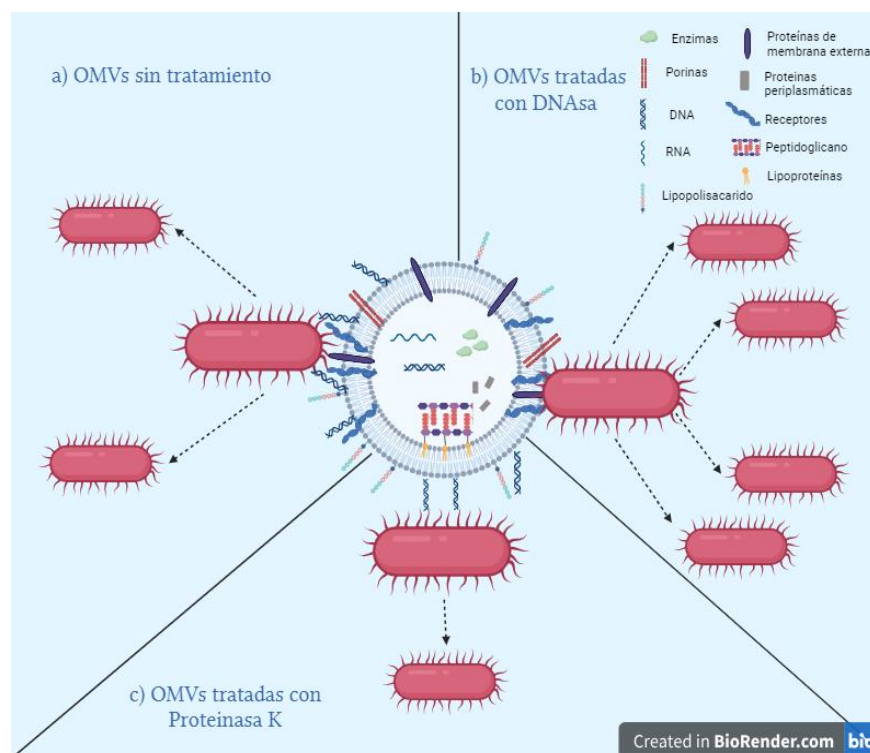


Figura 9. Modelo sugerido de los mecanismos de transferencia genética en las OMV's a las bacterias. Las microvesículas que estuvieron en contacto con las bacterias fueron OMVs sin tratamiento y tratadas con DNAsa y Proteinasa K. En todos los casos se presentaron diferencias en el crecimiento bacteriano. A) OMVs sin tratamiento; presentó un crecimiento regular. B) OMVs tratadas con DNAsa; crecieron de mejor manera en la mayoría de los ensayos. C) OMVs tratadas con Proteinasa K; presentaron menor crecimiento.

8.5 Inmunofluorescencia indirecta

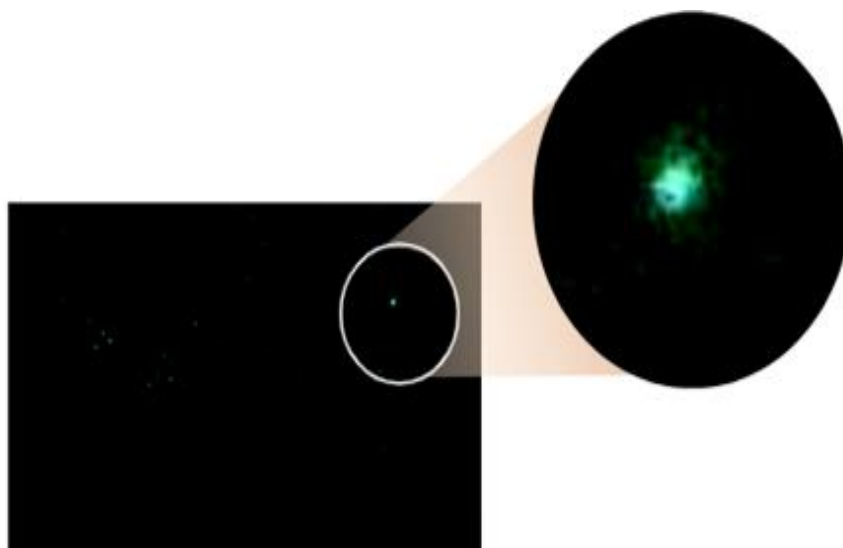
La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica de tinción fluorescente ampliamente utilizada en inmunología, se basa en las interacciones entre el anticuerpo y el antígeno. Con IFI es posible detectar la ubicación y morfología de bacterias, así como la ubicación de los anticuerpos marcados con fluorescencia (Janse & Kokoskova, 2009). Se realizó el método de IFI para identificar la presencia de proteínas en la membrana externa de las bacterias y de las OMV's. Los anticuerpos utilizados fueron homólogos anti-OMV's de *Klebsiella pneumoniae* y el anticuerpo heterólogo anti-Hienolasa (figura 11 A-E) Se realizaron tratamientos con proteinasa K (figura 11 D) y DNAsa (11 E) con el fin de identificar la presencia de proteínas y DNA externo en las OMV's.

La visualización de proteínas se realizó con ayuda del microscopio de epifluorescencia Motic® y la cámara ProgRES C14Plus®. La edición de las imágenes y el zoom digital se realizó con el programa ZEISS ZEN 3.9. Las imágenes obtenidas muestran la interacción de los anticuerpos a la membrana de las microvesículas y de las bacterias.

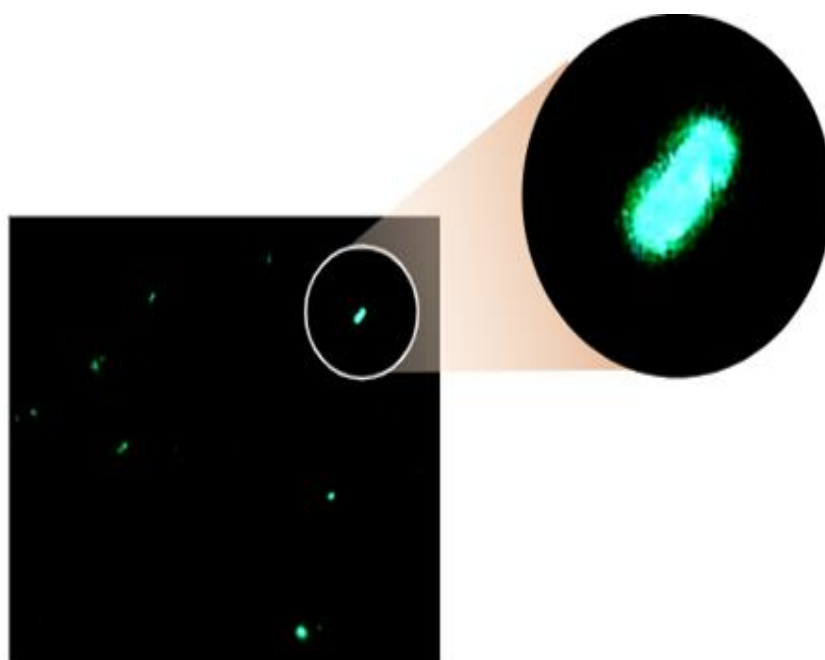
Las bacterias y OMV's que fueron tratadas con PK mostraron una disminución en la fluorescencia. Al adicionar PK antes de realizar la IFI, se degradan las proteínas presentes en la muestra, abarcando las proteínas de interés que podrían ser los antígenos que se buscan identificar a través de IFI. Esto puede afectar la capacidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno, provocando que se reduzca la señal de la IFI. En un estudio realizado por Nehmé y colaboradores en 2011 se observó la disminución de fluorescencia al adicionar PK en muestras de tejidos cerebrales.

Cuando se adicionó DNasa la estructura de la OMV's se mantuvo similar a la que no tuvo tratamientos y la fluorescencia no disminuyó, el uso de DNasa puede mejorar la especificidad de la detección de la fluorescencia al eliminar DNA no específico de la muestra y permitiendo una mayor unión del antígeno y el anticuerpo. Ye y colaboradores en 2006 realizaron un tratamiento previo con DNasa a tejido nervioso, resultando en una mejora en la identificación y ubicación de la proteína CKI p57Kip2 mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia indirecta (Weizhen Ye, *et al.*, 2016).

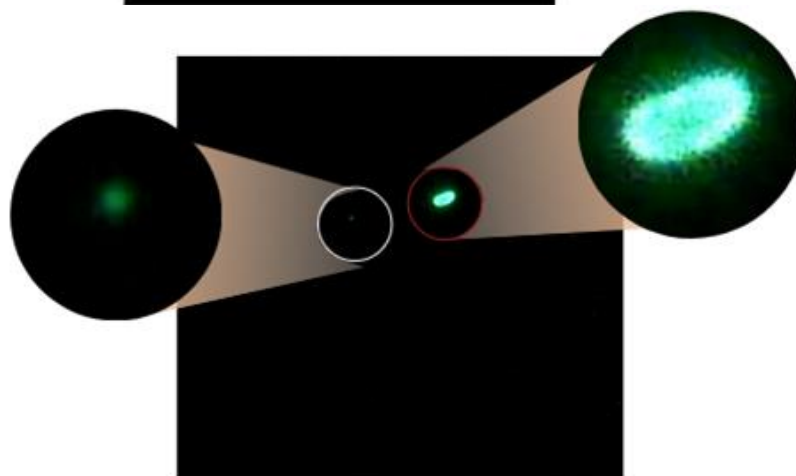
A)



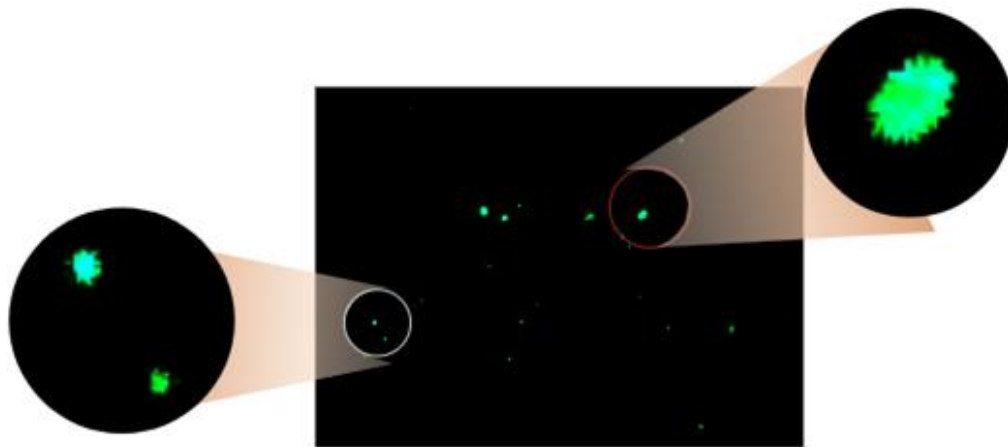
B)



C)



D)



E)

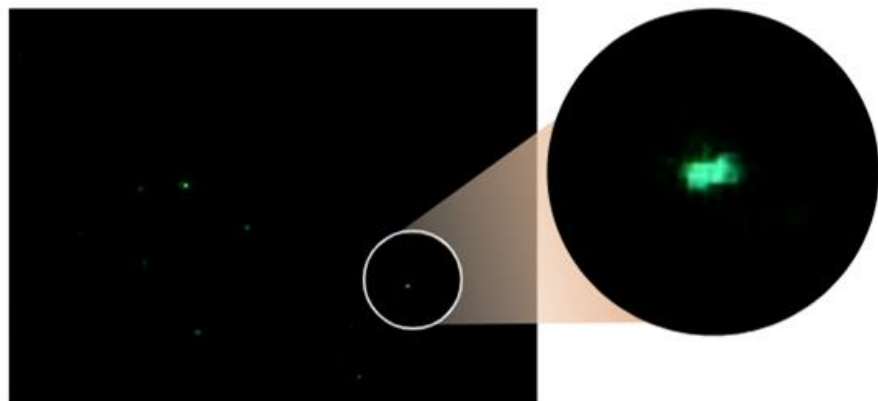


Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta. Imágenes a 100x con ampliación digital a 400x (círculos). El anticuerpo primario se utilizó en una dilución 1:1000, el Anticuerpo secundario (mouse anti-IgG acoplado a FITC) se utilizó en una dilución 1:5000. En los incisos a, b, d, e se utilizó como anticuerpo primario el homólogo anti-OMV's de *Klebsiella pneumoniae* 021., en el inciso c se utilizó el anticuerpo heterólogo anti-rNTHiENO. A) inmunofluorescencia indirecta elaborada en microvesículas de *K. pneumoniae*, B) inmunofluorescencia indirecta elaborada en *K. pneumoniae*. C) inmunofluorescencia indirecta elaborada en OMV's (círculo blanco) y *K. pneumoniae* (círculo rojo). D) Inmunofluorescencia indirecta elaborada en OMV's (círculo blanco) y *K. pneumoniae* (círculo rojo) ambos tratados con proteinasa K, E) Inmunofluorescencia indirecta elaborada en OMV's tratadas con DNAsa.

8.6 Pruebas de Antibiogramas

Se realizaron estudios de antibiogramas; con este estudio se tienen datos cualitativos que nos indican si la bacteria transformada presenta resistencia, sensibilidad o se encuentra en el intermedio de ambas características.

Se midieron las distancias de los halos de inhibición que se presentaron con respecto a cada antibiótico, recopilando estos datos se analizaron acorde a el CLSI 2023. En la tabla 6 y 7 se observan los perfiles de resistencia de *E. coli* transformada por las OMV's. La diferencia más notable entre los tratamientos en placa y tubos son la adquisición de resistencia a un mayor número de antibióticos. Las bacterias que fueron tratadas en placa mostraron un perfil de resistencia menor a los antibióticos presentes en el sensidisco, a diferencia de las bacterias que fueron tratadas en los tubos, estas últimas adquirieron resistencia principalmente a aminoglucósidos como: amikacina (AK), gentamicina (GE) y a netilmicina (NET).

El antibiótico al cual se observó no hubo transferencia de un mecanismo de resistencia por *Klebsiella pneumoniae* es el Sulfametoxazol /Trimetropim (STX). Tanto en los ensayos en placa y tubos las bacterias fueron sensibles a este antibiótico, con excepción de las *E. coli* que estuvieron en contacto con las OMV's de la cepa KpBUAP 321, estas bacterias se comportaron de forma distinta a las demás. Esta cepa presentó sensibilidad a los antibióticos: Ciprofloxacino (CPF), Amikacina (AK), Norfloxacin (NOF).

El ensayo en placas revela que las OMV's de KpBUAP 172, tratada con OMV's y PK, transfirió resistencia a 8 antibióticos. Por otro lado, las OMV's de KpBUAP 229 mostró resistencia constante a una serie de antibióticos, independientemente del tratamiento. Sin embargo, al ser tratada con DNAsa, se observó un aumento en la adquisición de resistencia, mientras que el tratamiento con PK mostró una modificación en la sensibilidad, manifestando una sensibilidad al Cloranfenicol (CL) en comparación con los otros casos.

Por su parte, las OMV's de KpBUAP 260, a la cual no se le aplicó ningún tratamiento, mostró resistencia a un mayor número de antibióticos (9) en comparación con las cepas que sí fueron tratadas. Solo mostró sensibilidad a STX.

Las OMV's tratadas con PK mostraron similitud con las no tratadas en términos de resistencia, con resistencia adicional a CFP y NET, y una sensibilidad intermedia a GE. Por último, las OMV's tratadas con DNAsa mostraron una resistencia reducida en comparación con las otras condiciones.

En cuanto a la última cepa estudiada, las OMV's de *KpBUAP 321*, cuando no hubo tratamiento, mostró una mayor adquisición de resistencia, manifestando sensibilidad únicamente a CPF, STX y GE. Las OMV's tratadas con PK mostraron sensibilidad a una amplia gama de antibióticos, incluidos CFP, STX, AK, GE, NET y NOF, y resistencia adicional al CL en comparación con los otros casos. Las OMV's tratadas con DNAsa mostraron un perfil de sensibilidad similar al de las tratadas con PK.

En el ensayo en tubos, se observó que la resistencia adquirida en las 4 cepas de *E. coli* fue mayor. Las OMV's de *KpBUAP 172*, sin tratamiento, mostraron la transferencia de resistencia a múltiples antibióticos comunes, incluidos CFP, CL y NOF, además de sensibilidad a STX y AK. Cuando se trató con DNAsa, la resistencia fue similar a la que no recibió tratamiento, excepto por la adición de resistencia a AK. Las OMV's tratadas con PK mostraron una reducción en la resistencia a CFP.

En cuanto a las OMV's de *KpBUAP 229*, tanto sin tratamiento como tratada con PK, se observó que la resistencia adquirida fue idéntica, siendo resistentes a 11 antibióticos y sensibles únicamente a STX. Sin embargo, cuando se trató con DNAsa, se redujo la resistencia a CFP y CL en comparación con los otros tratamientos, manteniendo la sensibilidad a STX.

Las OMV's de *KpBUAP 260* se comportó de manera similar a las OMV's de *KpBUAP 229*; las OMV's sin tratamiento y las tratadas con PK presentaron el mismo comportamiento en cuanto a resistencia y sensibilidad. Al ser tratadas las OMV's con DNAsa, se redujo la resistencia a CL en los 3 casos, manteniéndose la sensibilidad a STX.

Por último, las OMV's de *KpBUAP 321* mostraron transferencia de resistencia a varios antibióticos comunes en todas las condiciones, como NF, AM, CB, CF, CFX, CL, STX y NET. En las 3 condiciones, se mantuvo la sensibilidad a CFP y NOF. Cuando se realizaron tratamientos con DNAsa y PK, aumentó la sensibilidad a GE en comparación con las OMVs sin tratamiento.

Estos resultados sugieren que tanto la DNAsa como la Proteinasa K parecen influir en la sensibilidad a ciertos antibióticos en comparación con las OMVs sin tratamiento, con algunas diferencias entre los antibióticos afectados en cada condición.

Tabla 8. Perfil de resistencia antimicrobiano de las bacterias sembradas en placa.

		Resistente	Intermedio	Sensible
<i>KpBU AP 172</i>	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, CPF, NET, NOF		CL, STX, AK,GE
<i>KpBU AP 229</i>	OMV's + DNAsa	NF, AM, CB, CF, CFX, CL, NET, NOF		CPF, STX, AK, GE
	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, NET, NOF	CPF	CL, STX, AK, GE
	OMV's sin tratamiento	NF, AM, CB, CF, CFX, NET, NOF	CL	CPF, STX, AK, GE
<i>KpBU AP 260</i>	OMV's + DNAsa	NF, AM, CB, CF, CFX,	CL	CFP, STX, AK, GE, NET, NOF
	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, NET	GE	CL, STX, AK, NOF

	OMV's sin tratamiento	NF, AM, CB, CF, CFX, AK, GE, NET, NOF	CPF, CL	STX
<i>Kp</i> <i>BUAP</i> 321	OMV's + DNAsa	NF, AM, CB, CF, CFX,	CL	CFP, STX, AK, GE, NET, NOF
	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, CL		CFP, STX, AK, GE, NET, NOF
	OMV's sin tratamiento	NF, AM, CB, CF, CFX, NET, NOF	CL, AK	CPF, STX, GE

Crecimiento de *E. coli* tratados con las microvesículas solas, OMVs con proteinasa K, OMVs con DNAsa. Abreviaciones y concentraciones: Amikacina (AK) 30 mcg, Ampicilina (AM) 10 mcg, Carbenicilina (CB) 100 mcg, Cefalotina (CF) 30 mcg, Cefotaxima (CFX) 30 mcg, Ciprofloxacino (CPF) 5 mcg, Cloranfenicol (CL) 30 mcg, Gentamicina (GE) 10 mcg, Netilmicina (NET) 30 mcg, Nitrofurantoína (NF) 300 mcg, Norfloxacino (NOF) 10 mcg y Sulfametoxazol /Trimetropim (STX) 25 mg.

Tabla 9. Perfil de resistencia antimicrobiano de las bacterias sembradas en tubos.

		Resistente	Intermedio	Sensible
<i>KpBU</i> <i>AP</i> 172	OMV's sin tratamiento	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, CL, GE, NET, NOF		STX, AK
	OMV's + DNAsa	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, CL, GE, NET, NOF, AK		STX
	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, AK, GE, NET, NOF	CFP	CL, STX

KpBU AP 229	OMV's sin tratamiento	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, CL, GE, AK, NET, NOF		STX
	OMV's + DNAsa	NF, AM, CB, CF, CFX, AK, GE, NET, NOF	CFP, CL	STX
	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, CL, AK, GE, NET, NOF		STX
KpBU AP 260	OMV's sin tratamiento	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, CL, AK, GE, NET, NOF		STX
	OMV's + DNAsa	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, AK, GE, NET, NOF	CL	STX
	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, CFP, CL, AK, GE, NET, NOF		STX
KpBU AP 321	OMV's sin tratamiento	NF, AM, CB, CF, CFX, CL, STX, GE, NET		CFP, AK, NOF
	OMV's + DNAsa	NF, AM, CB, CF, CFX, CL, STX, AK, NET		CFP, GE, NOF
	OMV'S + Proteinasa K	NF, AM, CB, CF, CFX, CL, STX, NET		CFP, AK, GE, NOF

Crecimiento de *E. coli* tratados con las microvesículas solas, OMVs con proteinasa K, OMVs con DNAsa. Abreviaciones y concentraciones: Amikacina (AK) 30 mcg, Ampicilina (AM) 10 mcg, Carbenicilina (CB) 100 mcg, Cefalotina (CF) 30 mcg, Cefotaxima (CFX) 30 mcg, Ciprofloxacino (CPF) 5 mcg, Cloranfenicol (CL) 30 mcg, Gentamicina (GE) 10 mcg, Netilmicina (NET) 30 mcg, Nitrofurantoína (NF) 300 mcg, Norfloxacino (NOF) 10 mcg y Sulfametoxazol /Trimetropim (STX) 25 mgc.

8.7 Extracción de DNA genómico

Se realizó la extracción del DNA genómico de las *E. coli* DH5 α que estuvieron en incubación con las OMV's de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y que lograron sobrevivir a la concentración alta del antibiótico ampicilina. La extracción se realizó por la técnica fenol-cloroformo alcohol isoamílico, esta técnica nos permitió extraer satisfactoriamente el material genético (figura 12), posteriormente se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1%.

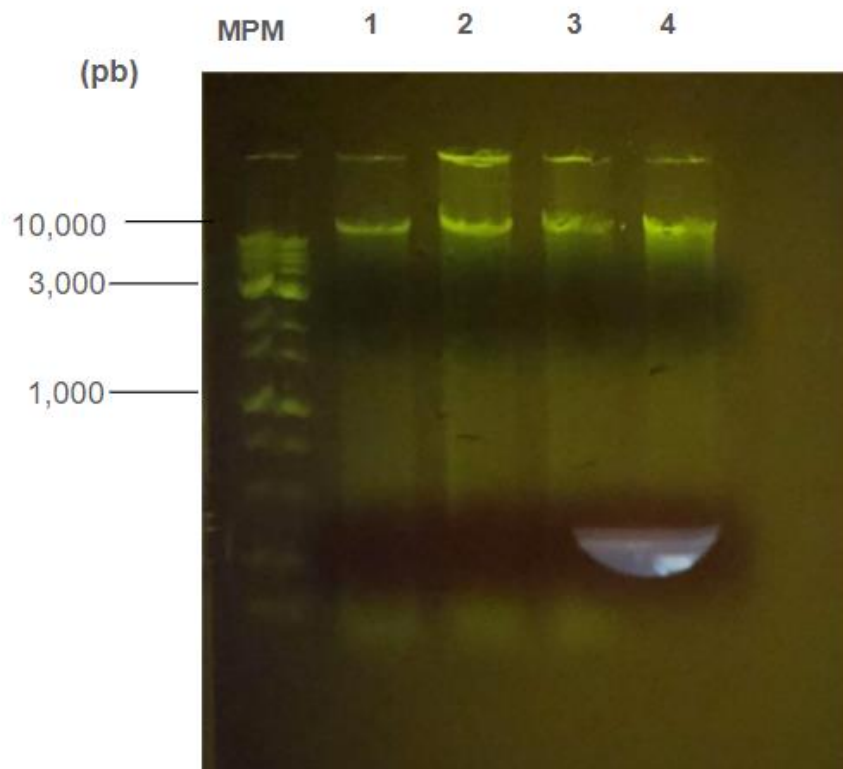


Figura 11. Electroforesis de gel de agarosa al 1% del DNA genómico obtenido. Carril MPM: Marcador de Peso Molecular; carril 1: *E. coli* tratada con OMV's de KpBUAP172.; carril 2: *E. coli* tratada con OMV's de KpBUAP 229; carril 3: *E. coli* tratada con OMV's de KpBUAP 260; carril 4: *E. coli* tratada con OMV's de KpBUAP 321.

8.8 PCR

Una vez extraído el material genético y haber corroborado su integridad se realizaron PCRs para detectar genes de resistencia que las bacterias podrían haber

adquirido. Se detectó la presencia del gen *bla_{KPC}* (figura 13, flecha rosa), este tiene un tamaño de 882 pb y se amplificó a 58 °C. En la figura 14 se muestra la amplificación del gen *bla_{TEM}*, con un tamaño de 526 pb, señalado con la flecha rosa. El gen *bla_{TEM}* se amplificó entre las temperaturas 56-58°C. Ambos genes fueron encontrados en *E. coli* DH5α que estuvo en contacto con las OMV's de la cepa *K. pneumoniae* 172.

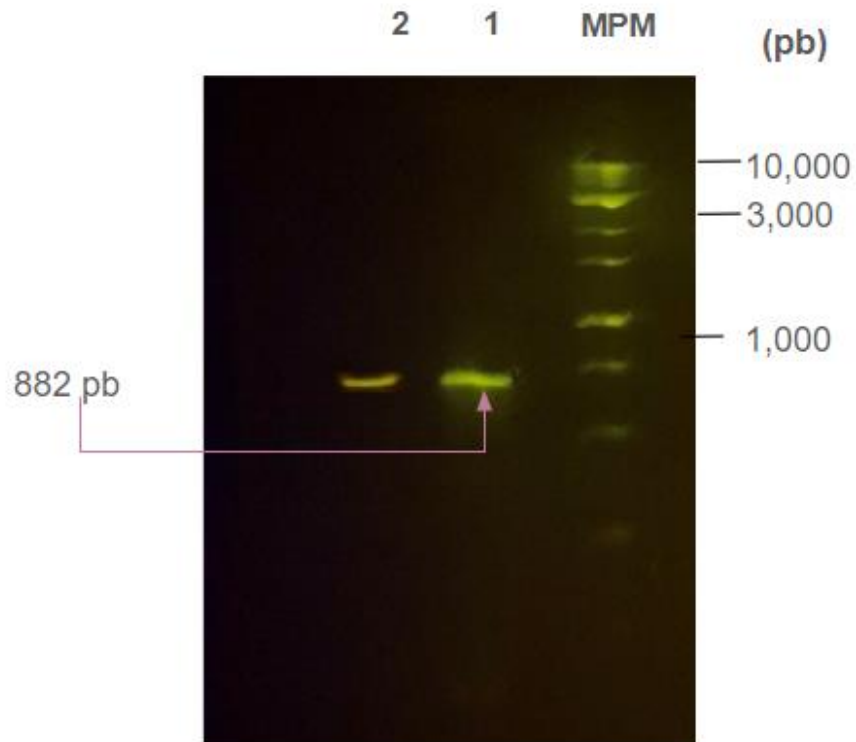


Figura 12. Electroforesis de gel de agarosa al 1% del amplificado del gen *bla_{TEM}*. Carril MPM: Marcador de Peso Molecular, carril 1; *E. coli* tratado con OMVs de *K. pneumoniae* 172, carril 2; *K. pneumoniae* ATCC700603, ambos amplificados a 58°C.

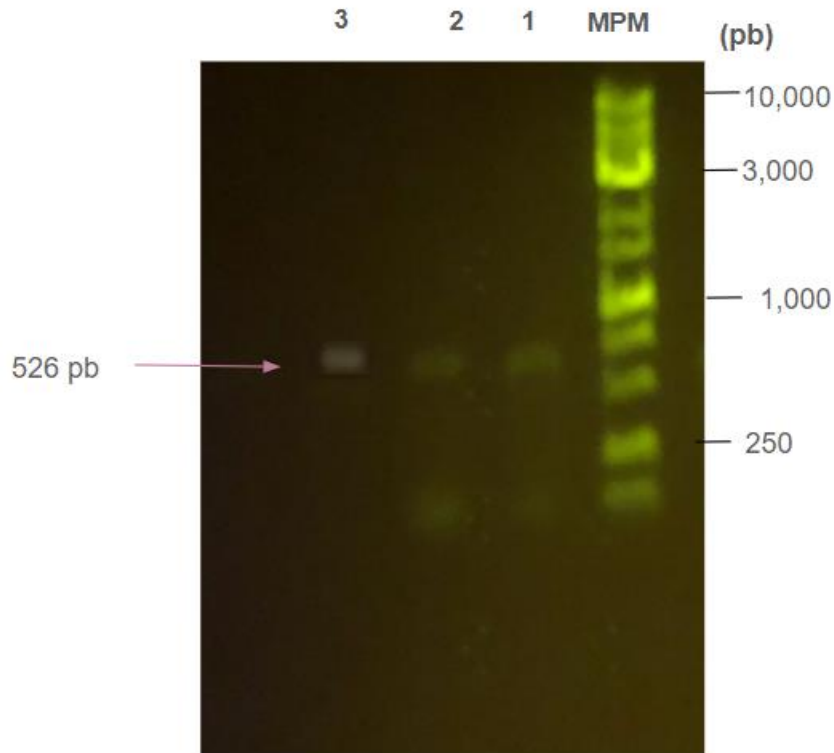


Figura 13. Electroforesis de gel de agarosa al 1% del amplificado del gen *bla*_{KPC}. Carril MPM: Marcador de Peso Molecular, carril 1; *E. coli* tratado con OMVs de *K. pneumoniae* 172, amplificado a 58° C; carril 2; *E. coli* tratado con OMVs de *K. pneumoniae* 172, amplificado a 56° C; carril 3; *K pneumoniae* ATCC700603 amplificado a 58°C.

9 Discusión

El propósito central de esta investigación fue determinar si aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* tienen la capacidad de secretar microvesículas y además si estas pueden transferir mecanismos de resistencia a antimicrobianos. Los resultados confirman la relevancia de las OMV's en las interacciones bacterianas, demostrando su papel crítico en la supervivencia frente a concentraciones letales de antibióticos. Además, se identificó la presencia de proteínas y ADN externo en las OMVs, destacando la transferencia exitosa de resistencia de estas microvesículas a otras bacterias.

Klebsiella pneumoniae, una bacteria gramnegativa, demostró su capacidad para secretar microvesículas de membrana externa. Se aplicó estrés mediante antibiótico

para inducir la sobreexpresión de estas microvesículas, las cuales mostraron una morfología esférica. Las cuatro cepas estudiadas (172, 229, 260 y 321) fueron capaces de secretar microvesículas (ver Figura 6) después de un periodo de incubación con antibióticos. Las OMV's de *K. pneumoniae* tienen un tamaño que oscila entre 40 a 170 nm, al ser observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) (Espinoza Hernández, Tesis de Maestría en Microbiología, comunicación directa).

El estrés inducido por los antibióticos puede causar rupturas en el ADN, desencadenando la respuesta SOS. Como parte de esta respuesta, se pueden producir cambios en la síntesis de lipopolisacáridos (LPS), lo que altera la composición de la membrana y aumenta la secreción de OMV's (Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Para obtener una concentración significativa de OMV's altamente purificadas, se utilizaron métodos que incluyeron centrifugación diferencial, filtración, precipitación. La adición de la filtración después de la centrifugación aseguró la eliminación de contaminantes en nuestras muestras. Dado que la cantidad total de OMV's en el medio suele ser muy baja, se realizó un paso de preconcentración, siendo la precipitación uno de los métodos más empleados. En este paso, la acetona fue el disolvente seleccionado debido a que, al tiempo que promueve la precipitación, también disuelve moléculas no polares. Este proceso es seguido por la centrifugación, que se utiliza para la sedimentación de las OMV's (Bodzoń-Kuřakowska *et al.*, 2013; Klimentová & Stulík, 2015).

Se llevó a cabo un ensayo de protección contra antibióticos para evaluar si las microvesículas de membrana externa (OMV) ofrecen protección a bacterias susceptibles, en este caso, *E. coli* DH5 α . Los resultados obtenidos indican que las OMV's sí brindan protección a bacterias, independientemente del género. Estudios anteriores (Furuyama & Sircili, 2021; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Schwechheimer & Kuehn, 2015), han demostrado que las microvesículas pueden actuar como señuelos, absorbiendo o transportando toxinas fuera de la célula, lo que promueve la proliferación bacteriana.

Además de reducir la concentración efectiva de antibióticos en el cultivo mediante adsorción, las OMV's también tienen la capacidad de transportar enzimas que facilitan la protección antibiótica (Schwechheimer & Kuehn, 2015). En la mayoría de las bacterias Gram-negativas, la actividad de las β -lactamasas desempeña un papel crucial en el incremento del nivel intrínseco de resistencia a las penicilinas y cefalosporinas (Bonnington & Kuehn, 2014).

En el estudio de Oana Ciofu y colaboradores en 2000 se demostró que las OMV's secretadas por *P. aeruginosa* tienen la actividad de β -lactamasa y la emplean como un medio para promover la resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Ciofu, *et al.*, 2000). La resistencia adquirida a través de este mecanismo de exportación de OMV's se convierte en un bien compartido, dado que la β -lactamasa extracelular beneficia a toda la población bacteriana y no solo a las células que generan dicho recurso (Bonnington & Kuehn, 2014).

Se sabe que las OMV's contienen material genético, como se ha observado en OMV's secretadas por *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* competentes, así como en *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* O157:H7 no competentes (Renelli *et al.*, 2004). Se ha hipotetizado que las OMV's podrían contener ADN externo, el cual podría ser adquirido al lisar las células, liberando fragmentos de ADN que eventualmente podrían unirse a la superficie cargada positivamente de las microvesículas (Kulkarni & Jagannadham, 2014).

Las proteínas contenidas en las microvesículas pueden ir desde proteínas estructurales, porinas, canales iónicos, enzimas periplásmicas y citoplasmáticas y proteínas relacionadas con respuestas al estrés (Kulkarni & Jagannadham, 2014). El análisis llevado a cabo por Campos Ortiz en 2021 evidenció la existencia de doce bandas enriquecidas de proteínas, con diversos pesos moleculares, en el contenido de vesículas de membrana externa (OMVs) de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (Ortiz, 2021).

Los tratamientos con DNAsa y Proteinasa K evidenciaron la importancia de las proteínas externas en la interacción microvesícula-bacteria. Adicionalmente, este

estudio evidenció que el ADN estaba resguardado de la degradación por la enzima DNasa, lo que indica que el ADN se encuentra encapsulado dentro de las vesículas.

En un estudio realizado por Yaron y colaboradores en el 2000 donde se estudiaron OMV's producidas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae*, se demostró que el DNA se encontraba protegido de la digestión de las DNAsa (Yaron *et al.*, 2000).

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos, en tubos y placas; ambos arrojaron resultados similares, aunque no idénticos. Los resultados del ensayo en placas (tabla 6) indican que hubo crecimiento en el 77.77% de los casos, siendo únicamente las bacterias incubadas con las microvesículas provenientes de la cepa 172, sin tratamiento y tratadas con DNAsa, las que no presentaron crecimiento, esto probablemente debido a que no hubo una adecuada interacción entre las OMV's y las bacterias y por lo tanto no hubo una transferencia del cargo de las microvesículas.

En el ensayo en tubos sí se presentó crecimiento en todos los casos. Los datos cuantitativos obtenidos sobre el crecimiento de *E. coli* DH5 α después de la incubación con las microvesículas demuestran que, en todos los casos, al ser tratadas las OMV's con proteínasa K se presenta un menor crecimiento bacteriano. Por otro lado, cuando se tratan las OMV's con DNAsa se registra un mayor crecimiento en el 75% de los casos en comparación con las OMVs sin tratamiento (tabla 7). Para corroborar que nuestros resultados son significativos realizamos un análisis estadístico mediante la prueba de Tukey.

Los resultados del análisis Tukey indican que nuestros datos son significativos. Solo en dos casos no se observó significancia: en los ensayos realizados con la cepa 172, al comparar los datos de las OMV tratadas con DNAsa y proteínasa K, y en la cepa 229, al comparar los datos de las OMV sin tratamiento y tratadas con DNAsa (figura 9).

Basándonos en los resultados presentados en la Figura 7 y en el análisis Tukey (figura 8), predijimos el comportamiento de las OMV's al ser tratadas con DNAsa y Proteinasa K (figura 9). La adición de DNAsa resultó en la limpieza de la parte externa de las microvesículas, dejando los receptores libres para la unión con las bacterias y provocando una mayor proliferación bacteriana. Por otro lado, al agregar proteinasa K se eliminaron todas las proteínas, incluyendo los receptores, lo que impidió que las bacterias pudieran unirse a las microvesículas, resultando en una menor transferencia de genes y por lo tanto se observó un menor crecimiento bacteriano.

En la prueba de inmunofluorescencia indirecta (figura 10), se detectaron proteínas inmunogénicas vinculadas a las OMV's secretadas por *K. pneumoniae*. Se utilizaron dos tipos de anticuerpos primarios, el anti-OMV's (figura 10, a, b, d, e) y el anti-rNTHiENO (figura 10 c). En ambos casos, se observó interacción entre los anticuerpos y las OMV's, lo que indica que las microvesículas contienen proteínas externas, como la enolasa.

El anticuerpo anti enolasa utilizado fue el anti-rNTHiENO, el cual fue desarrollado en *Haemophilus influenzae* por Osorio-Aguilar y colaboradores en 2021. Al observar una reacción con un anticuerpo heterólogo, sugiere que esta proteína asociada podría estar conservada entre las bacterias Gram-negativas.

En el estudio realizado por A. Toledo y colaboradores en 2012, se identificó que la liberación de las OMV's provenientes de *Borrelia burgdorferi* llevan dentro de su estructura enolasa. Esto plantea la posibilidad de que estas OMV puedan abastecer de nutrientes bacterianos a los patógenos durante su proceso de colonización al hospedero (Toledo *et al.*, 2012).

El resultado de la presencia de la enolasa en la membrana externa de las OMV's, puede indicar su actividad como un receptor para el plasminógeno presente en el hospedero. Esta proteína se activa mediante procesos proteolíticos, convirtiéndose en la proteasa plasmina. Esta enzima puede facilitar la degradación de las proteínas de la matriz extracelular de las células del hospedero, lo cual puede favorecer la

propagación de la bacteria hacia otros tejidos. Además, este proceso posiblemente genera nutrientes que la bacteria puede utilizar para su crecimiento (Schwechheimer & Kuehn, 2015).

Los ensayos con PK y DNasa también fueron analizados mediante inmunofluorescencia indirecta. Las imágenes analizadas muestran que, en el caso de las OMV's tratadas con PK, se observó la destrucción de la membrana de las microvesículas y de las bacterias (ver figura 10, D), lo que sugiere la presencia de diversas proteínas externas. Por otro lado, en el caso de las OMV's tratadas con DNasa (ver figura 10, E), también se evidenció una pequeña deformación en la membrana. Estos resultados proporcionan información adicional sobre la composición de las OMV's, especialmente en lo que respecta a su membrana externa.

K. pneumoniae es reconocida como una fuente significativa de resistencia a los antibióticos, principalmente debido a la alta presencia de genes de resistencia antimicrobiana (ARG, por sus siglas en inglés). Estos genes son responsables de la aparición y la diseminación de cepas que muestran resistencia a múltiples fármacos (MDR) y a una amplia gama de medicamentos (XDR) (Lucena *et al.*, 2023). Se considera que las OMV's secretadas, por ejemplo, por *K. pneumoniae*, pueden mediar la transferencia horizontal de genes, promoviendo el desarrollo de la resistencia a antibióticos (Hussein *et al.*, 2023). Para reconocer si existió transferencia de resistencia entre las OMV's y la *E. coli* DH5 α transformadas se llevaron a cabo pruebas de resistencia a antimicrobianos en las cuatro cepas estudiadas.

El ensayo de susceptibilidad a antibióticos revela la importancia de las microvesículas de membrana externa en la supervivencia bacteriana y su papel crucial en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos. Este estudio comparó bacterias sometidas a diferentes tratamientos, tanto en placas como en tubos, para comprender mejor su respuesta a los antibióticos. Los resultados muestran una diferencia notable entre las bacterias que crecieron en placas y aquellas cultivadas en tubos. Específicamente, se observó que las bacterias que

crecieron en tubos adquirieron resistencia a un mayor número de antibióticos, destacando especialmente la amikacina (AK), la gentamicina (GE) y la netilmicina (NET). Esta discrepancia resalta la influencia del entorno de crecimiento en la resistencia bacteriana y sugiere que las condiciones en los tubos favorecen una mayor adquisición de resistencia a los antibióticos. Esto podría estar relacionado con una mayor exposición a las microvesículas de membrana externa en este entorno, lo que facilita la transferencia de genes de resistencia entre las bacterias.

Tanto en el ensayo en placas (tabla 8) como en el de tubos (tabla 9), se observa un perfil de resistencia similar entre las cuatro cepas evaluadas. Mostrando pequeñas diferencias entre los tratamientos con PK y DNAsa. En todos los casos, excepto para la cepa *KpBUAP* 321 cultivada en tubos, se encontraron sensibles a Sulfametoxazol/Trimetoprima (STX), lo que sugiere que este antibiótico sería una opción óptima en caso de infección por estas cepas. Sin embargo, para la cepa *KpBUAP* 321, los antibióticos efectivos son Ciprofloxacino (CPF), Amikacina (AK) y Norfloxacino (NOF).

Finalmente, para corroborar la transferencia de genes de resistencia provenientes de *K. pneumoniae* se realizó la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa. Se amplificaron los genes *bla_{TEM}* (figura 12) y *bla_{KPC}* (figura 13). Las microvesículas a través de la transferencia horizontal, tienen la capacidad de convertir bacterias originalmente no resistentes, como *E. coli* DH5 α , en una cepa que desarrolla resistencia.

Este fenómeno ha sido observado en estudios previos, como el realizado por Yaron y colaboradores en 2000 donde se demostró que la transmisión de genes entre especies bacterianas fue facilitada por vesículas obtenidas del patógeno *E. coli* O157:H7, lo que permitió la transferencia de genes a *E. coli* JM109 y *Salmonella enterica*, incluyendo fragmentos de ADN. Esta interacción podría estar asociada con genes responsables de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos (Yaron *et al.*, 2000).

Asimismo, se ha evidenciado que las OMV's de *Acinetobacter baumannii* pueden facilitar la transferencia de resistencia a los carbapenémicos mediante el ADN que

lleva genes asociados a la resistencia a los antibióticos y mediante la actividad enzimática de resistencia a los antibióticos (Schwechheimer & Kuehn, 2015).

En el estudio realizado por Ping Li y colaboradores en 2022, se demostró que las vesículas de membrana externa de *K. pneumoniae* hipervirulentas y resistentes a los carbapenémicos (CR-HvKP), contenían tanto genes de virulencia como de resistencia a antibióticos. Estas OMV's de CR-HvKP tienen la capacidad de transferir genes de virulencia y resistencia a los medicamentos a la cepa ATCC700603 *K. pneumoniae*, lo que resulta en la producción de una cepa CR-HvKP con un fenotipo que exhibe mayor resistencia a los medicamentos y virulencia (P. Li *et al.*, 2022).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede inferir que las microvesículas de membrana externa contienen genes de resistencia a antibióticos y estos pueden ser transferidos horizontalmente a bacterias sin importar que no sean del mismo género.

10. Conclusiones

Este trabajo de tesis nos permite reconocer las siguientes conclusiones:

- ★ Los cuatro aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* estudiados tienen la capacidad de secretar OMV's, especialmente en condiciones adversas, como la presencia del antibiótico ampicilina, que actúa como un factor de estrés.
- ★ Las OMV's confieren protección a las bacterias sensibles a antibióticos, promoviendo su supervivencia y proliferación.
- ★ El uso de Proteinasa K y DNasa modifican la adquisición de resistencia y sensibilidad a diversos antibióticos.
- ★ El entorno de interacción de las microvesículas es importante para la transferencia de elementos genéticos capaces de conferir resistencia bacteriana.
- ★ *K. pneumoniae* es capaz de transferir genes de resistencia a través de las OMV's a una bacteria no resistente, en este caso *E. coli* DH5 α . Los amplificadores resultaron positivos para los genes bla_{TEM} y bla_{KPC}.

- ★ La técnica de inmunofluorescencia indirecta revela la presencia de proteínas inmunogénicas asociadas a OMV's de *K. pneumoniae*.
- ★ Se detectó que la proteína enolasa se encuentra en el exterior de las microvesículas.

11. Perspectivas

- ★ Identificar la presencia de genes transferidos de las microvesículas a bacterias que le proporcionen resistencia a múltiples antibióticos.
- ★ Identificar proteínas presentes en la membrana externa de las microvesículas.
- ★ Analizar el papel de las OMV's secretadas de *K. pneumoniae* en la fisiopatología de la bacteria.

12. Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
bla	Genes de resistencia a betalactamasas
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
g	Gramos

hvKp	Hipervirulentas
hrs	Horas
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MAMP	Patrones moleculares asociados a microorganismos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mg	Miligramos
MGEs	Elementos genéticos móviles
MPM	Marcador de Peso Molecular
MDR	Multirresistentes
nm	Nanómetros
OM	Membrana externa
OMV's	Microvesículas de Membrana Externa
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PG	Peptidoglicano
PK	Proteinasa K
PQS	Quinolona de <i>Pseudomonas</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa
rpm	Revoluciones por minuto
TAE	Tris-Acetate-EDTA

TEM	Temoniera
TLR	Receptores transmembrana tipo Toll
V	Voltios

13. Anexos

Tabla N1. Resistencia a antibióticos de cepas *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes con infección nosocomial del Hospital de la mujer.

Antibiograma CEPAS <i>Klebsiella pneumoniae</i>															
No de cepa	Antibióticos β -lactámicos									Aminoglucosidos				Quinolonas	Tetraciclinas
	Periciclina		β -lactámico inhibidor	cefalosporinas			Monobactem	Carbapenems							
	AM	PIP		AMC	CAZ	CTX		FEP	ATM	IMP	MEM	GM	S	AN	NN
172	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
229	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
260	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S

*AM: ampicilina, PIP: Piperacilina, AMC: Amoxicilina, CAZ, Ceftazidima, CTX: Cefalosporina, FEP: Cefepime, ATM; Aztreonam, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, GM: Gentamicina, S: Estreptomicina, AN: Amikacina, NN: Tobramicina, CIP: Ciprofloxacina, TE: Tetraciclina.

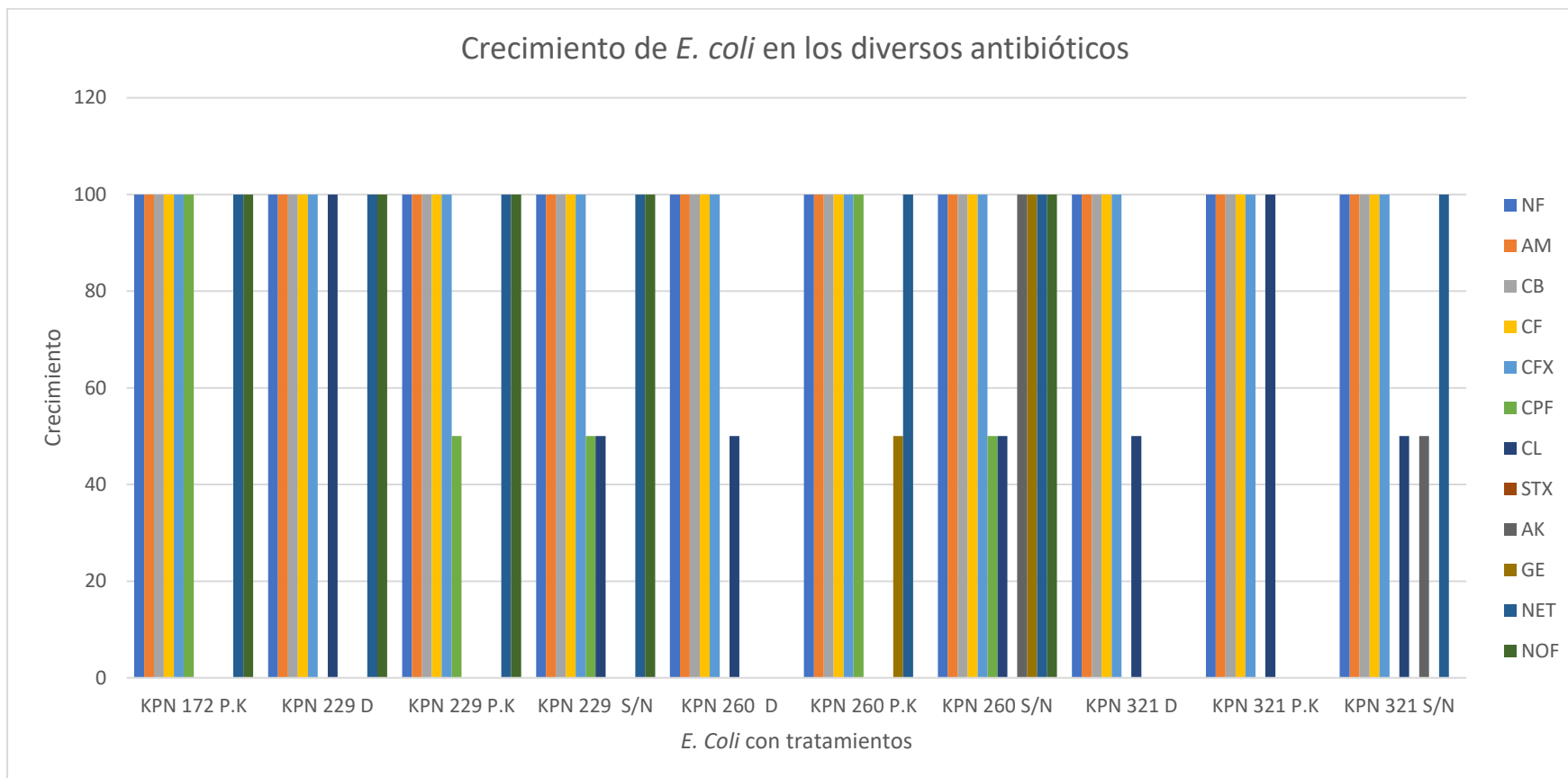


Figura N2. Ensayo de sensidiscos de las bacterias sembradas en placas. Crecimiento de *E. Coli* tratados con las microvesículas solas (S/N), OMVs con proteinasa K (PK), las OMVs con DNAsa (D). El 100 % representa que la bacteria es resistente al antibiótico, el 50 % que es intermedio y el 0 % que presenta sensibilidad.

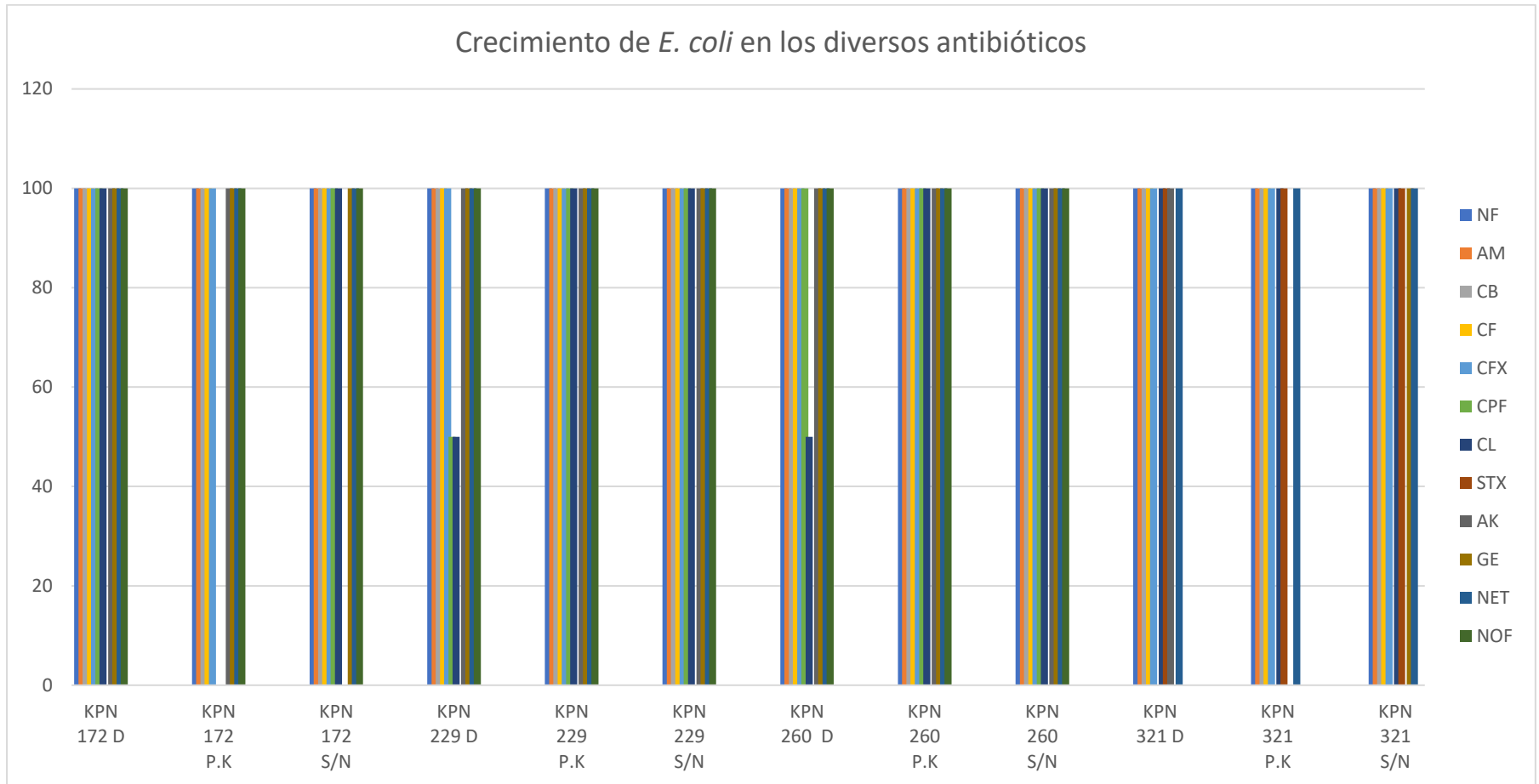


Figura N3. Ensayo de sensidiscos de las bacterias sembradas en tubos. Crecimiento de *E. Coli* tratados con las microvesículas solas (S/N), OMVs con proteinasa K (PK), las OMVs con DNAsa (D). El 100 % representa que la bacteria es resistente al antibiótico, el 50 % que es intermedio y el 0 % que presenta sensibilidad.

Participaciones en congresos y exposición de carteles

- XLVII Congreso Nacional Infectología y Microbiología Clínica, modalidad cartel. “Microvesículas bacterianas secretadas y su importancia en la multidrogorresistencia” (Mayo 2023)
- 1er lugar en exposición de carteles en el 10° aniversario de Biotecnología, en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. “Transferencia de genes de resistencia mediante OMvs: *Klebsiella pneumoniae* como modelo” (Octubre 2023)
- Simposio de Farmacología: Combatiendo la Resistencia a los Antimicrobianos, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en la modalidad cartel. “Transferencia de genes de resistencia mediante OMvs: *Klebsiella pneumoniae* como modelo” (Noviembre 2023)
- Congreso Internacional Virtual del XXVIII Verano de la Investigación Científica y Tecnológicas del Pacífico. “Análisis de la expresión de factores de virulencia con interés para el desarrollo de vacunas” (Octubre 2023)
- 3er lugar en el XLI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica. Modalidad presentación oral de trabajos libres. “Análisis molecular de la transferencia horizontal de genes de resistencia a β lactamasas mediante OMV’s de *Klebsiella pneumoniae* “ (diciembre 2023)

14. Bibliografía

- Arato, V., Raso, M. M., Gasperini, G., Scorza, F. B., & Micoli, F. (2021). Prophylaxis and Treatment against *Klebsiella pneumoniae*: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 4042, 22(8), 4042. <https://doi.org/10.3390/IJMS22084042>
- Ballén, V., Gabasa, Y., Ratia, C., Ortega, R., Tejero, M., & Soto, S. (2021). Antibiotic Resistance and Virulence Profiles of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Different Clinical Sources. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.738223>
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Mejia-Miranda, I., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., Mosqueda-García, D., & Silva-Sanchez, J. (2017). ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* : The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.008>
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(2), 123–144. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>
- Bodzoń-Kuřakowska, A., Drabik, A., Mielczarek, P., Sucharski, F., Smoluch, M., Suder, P., & Silberring, J. (2013). Fundamental Strategies of Protein and Peptide Sample Preparation. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (pp. 25–77). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59378-8.00003-7>
- Bomberger, J. M., MacEachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S., O'Toole, G. A., & Stanton, B. A. (2009). Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000382. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000382>
- Bonnington, K. E., & Kuehn, M. J. (2014). Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(8), 1612. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.12.011>
- Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *Journal of Internal Medicine*, 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
- Ciofu, O. (2000). Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(1), 9–13. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.9>
- Cruz-Córdova, A., Esteban-Kenel, V., Espinosa-Mazariego, K., Ochoa, S. A., Moreno Espinosa, S., De La Garza Elhain, A., Rendón, E. F., Oliver, E., Villegas, L., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2014). Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains associated with their

persistence in the hospital environment. In *Bol Med Hosp Infant Mex* (Vol. 71, Issue 1).
www.elsevier.es

- Davoudabadi, S., Goudarzi, M., & Hashemi, A. (2023). Detection of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iran. *BioMed Research International*, 2023, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2023/3624497>
- Dell'Annunziata, F., Dell'Aversana, C., Doti, N., Donadio, G., Dal Piaz, F., Izzo, V., De Filippis, A., Galdiero, M., Altucci, L., Boccia, G., Galdiero, M., Folliero, V., & Franci, G. (2021). Outer Membrane Vesicles Derived from *Klebsiella pneumoniae* Are a Driving Force for Horizontal Gene Transfer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8732. <https://doi.org/10.3390/ijms22168732>
- Devos, S., Stremersch, S., Raemdonck, K., Braeckmans, K., & Devreese, B. (2016). Intra- and Interspecies Effects of Outer Membrane Vesicles from *Stenotrophomonas maltophilia* on β -Lactam Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), 2516–2518. <https://doi.org/10.1128/AAC.02171-15>
- Dhital, S., Deo, P., Bharathwaj, M., Horan, K., Nickson, J., Azad, M., Stuart, I., Chow, S. H., Gunasinghe, S. D., Bamert, R., Li, J., Lithgow, T., Howden, B. P., & Naderer, T. (2022). *Neisseria gonorrhoeae* -derived outer membrane vesicles package β -lactamases to promote antibiotic resistance. *MicroLife*, 3. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqac013>
- Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 81–94. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-09>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2021/1490732>
- Gilmore, W. J., Bitto, N. J., & Kaparakis-Liaskos, M. (2021). Pathogenesis Mediated by Bacterial Membrane Vesicles. In *New Frontiers: Extracellular Vesicles. Subcellular Biochemistry* (Vol. 97, pp. 101–150). https://doi.org/10.1007/978-3-030-67171-6_6
- Hafiz, T. A., Alanazi, S., Alghamdi, S. S., Mubarak, M. A., Aljabr, W., Madkhali, N., Alharbi, S. R., Binkhamis, K., & Alotaibi, F. (2023). *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia epidemiology: resistance profiles and clinical outcome of King Fahad Medical City isolates, Riyadh, Saudi Arabia. *BMC Infectious Diseases*, 23(1), 579. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08563-8>
- Herrera Dutan, E. V., Campoverde, D. A., & Reinoso Rojas, Y. V. (2021). Resistencia antimicrobiana en *Klebsiella pneumoniae*, Ecuador. *Revista Vive*, 4(12), 470–483. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.107>
- Hussein, M., Jasim, R., Gocol, H., Baker, M., Thombare, V. J., Ziogas, J., Purohit, A., Rao, G. G., Li, J., & Velkov, T. (2023). Comparative Proteomics of Outer Membrane Vesicles from Polymyxin-Susceptible and Extremely Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *MSphere*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00537-22>

- Janse, J. D., & Kokoskova, B. (2009). *Indirect Immunofluorescence Microscopy for the Detection and Identification of Plant Pathogenic Bacteria (In Particular for Ralstonia solanacearum)* (pp. 89–99). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-062-1_8
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 170, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>
- Kulkarni, H. M., & Jagannadham, M. V. (2014). Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(10), 2109–2121. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.079400-0/CITE/REFWORKS>
- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>
- Li, P., Luo, W., Xiang, T.-X., Jiang, Y., Liu, P., Wei, D.-D., Fan, L., Huang, S., Liao, W., Liu, Y., & 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.945972>
- Liu, X., Xiao, J., Wang, S., Zhou, J., Qin, J., Jia, Z., Wang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., & Hao, H. (2022). Research Progress on Bacterial Membrane Vesicles and Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11553. <https://doi.org/10.3390/ijms231911553>
- Lucena, A. C. R., Ferrarini, M. G., de Oliveira, W. K., Marcon, B. H., Morello, L. G., Alves, L. R., & Faoro, H. (2023). Modulation of Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Vesicle Protein Cargo under Antibiotic Treatment. *Biomedicines*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11061515/S1>
- Magaña, G., Harvey, C., Taggart, C. C., & Rodgers, A. M. (2023). Bacterial Outer Membrane Vesicles: Role in Pathogenesis and Host-Cell Interactions. *Antibiotics*, 13(1), 32. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010032>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>

- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y., & Beveridge, T. J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, *150*(7), 2161–2169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0>
- Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H. R., González-Díaz, E., & Morfín-Otero, R. (2013). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, *34*(0), 181. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>
- Salawudeen, A., Raji, Y. E., Jibo, G. G., Desa, M. N. M., Neoh, H., Masri, S. N., Di Gregorio, S., & Jamaluddin, T. Z. M. T. (2023). Epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in clinical setting in South-Eastern Asia: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *12*(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01346-5>
- Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., & Haurat, M. F. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles: From Discovery to Applications. *Annual Review of Microbiology*, *75*(1), 609–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-052821-031444>
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*(10), 605. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3525>
- Sierra-Díaz, E., Hernández-Ríos, C. J., & Bravo-Cuellar, A. (2019). Antibiotic resistance: Microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. *Cirugía y Cirujanos*, *87*(2). <https://doi.org/10.24875/CIRU.18000494>
- Toledo, A., Coleman, J. L., Kuhlrow, C. J., Crowley, J. T., & Benach, J. L. (2012). The Enolase of *Borrelia burgdorferi* Is a Plasminogen Receptor Released in Outer Membrane Vesicles. *Infection and Immunity*, *80*(1), 359–368. <https://doi.org/10.1128/IAI.05836-11>
- Tricarico, C., Clancy, J., & D'souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, *8*. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>
- Uddin, M. J., Dawan, J., Jeon, G., Yu, T., He, X., & Ahn, J. (2020). The Role of Bacterial Membrane Vesicles in the Dissemination of Antibiotic Resistance and as Promising Carriers for Therapeutic Agent Delivery. *Microorganisms*, *8*(5), 670. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050670>
- Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L., & Matthews, K. R. (2000). Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes from *Escherichia coli* O157:H7 to Other Enteric Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *66*(10), 4414–4420.

Zhou, G., Shi, Q.-S., Huang, X.-M., & Xie, X.-B. (2015). The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21711–21733.
<https://doi.org/10.3390/ijms160921711>