



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL  
GENERADA POR LA INMUNIZACIÓN CON  
MICROVESÍCULAS SECRETADAS DE *Klebsiella  
pneumoniae*.**

Tesis que para obtener el título de

**LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

C. DULCE MÁRIA SÁNCHEZ PALACIOS

DIRECTOR : D. C. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

JUNIO 2022



## DEDICATORIAS

A mamá:

Para ti, Lupita, por ser uno de los pilares más importantes de todos mis éxitos. Gracias por siempre velar por mis sueños y creer en mí; por siempre festejar mis logros y por demostrarte a ti misma y demostrarme a mí que, a pesar de las adversidades, somos capaces de lograr todo lo que nos proponemos. Gracias por tu amor incondicional. Todo lo que soy es gracias a ti.

A papá:

A ti, Carlos, por cuidar siempre de mí, sobre todo cuando yo no podía hacerlo. Gracias por tu amor infinito; por dar lo mejor de ti conmigo; por acompañarme en todas las etapas de mi vida y ser el mejor compañero de viajes y conciertos. Gracias por apoyar mis sueños, mis locuras, mis anhelos y mis travesuras. Para ti siempre.

A mi hermano:

Para ti, Emilio, que siempre estas para mí, por ser mi compañero de vida y entenderme cuando ni yo lo hago. Gracias por tus abrazos, tus sonrisas, tu amor y tus miles de "tú puedes". Mi amor por ti es inconmensurable.

Los amo con todo mi corazón. Este logro es por y para ustedes.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecerle al Doctor Alejandro Carabarán Lima por darme la oportunidad de trabajar a su lado. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar en un proyecto que me apasiona tanto. Gracias por su acompañamiento, por compartir conmigo sus conocimientos y por todas las oportunidades que me brindó; pero sobre todo por la confianza que tuvo en mí. Sin su paciencia y cariño este trabajo no hubiera sido posible.

A mis revisores, la Doctora Patricia Lozano Zarin y el Doctor Ygnacio Martínez Laguna, por su tiempo y su asesoramiento. Gracias por ayudarme a crecer y por ser un ejemplo para mí.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por todos los apoyos y facilidades brindadas que permitieron la realización de este proyecto (100522577-VIEP2019 y 100031833-VIEP2021).

A Mónica, gracias por impulsarme a crecer y por siempre creer en mí, pero sobre todo, gracias por ayudarme a creer en mí misma. Gracias por ser mi inspiración, mi lugar seguro y gracias por tu cariño incondicional. Eres la mejor amiga que cualquier persona pudiera pedir. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo. No solo me enseñaste de ciencia, sino que me enseñaste a ser mejor persona.

A Eva, gracias por tu amistad y por abrirme tu corazón. Gracias por recordarme que la vida no es una carrera y que no hay razones para correr si nadie nos está persiguiendo. Gracias por todas las palabras que me dieron calma cuando mi tormenta de ideas no me dejaba ver con claridad.

A Daniela, gracias por enseñarme que la distancia y el tiempo no condicionan el amor; por toda la motivación que siempre me das; por inspirarme a seguir mis sueños y por todo lo que hemos vivido. Gracias por tu inagotable cariño.

A Angelita, gracias por comprarme mi primera bata para el laboratorio, esa que use desde el primer día, esa que simboliza que estoy siguiendo mis sueños. Te prometo seguir todos tus consejos y tus sabias palabras.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	
<b>DEDICATORIAS</b> .....	1
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	2
<b>ÍNDICE</b> .....	3
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1.1. Infecciones intrahospitalarias .....	7
1.2. Resistencia a antibióticos .....	11
1.3. Epidemiología e infecciones nosocomiales en México .....	11
1.4. Enterobacterias .....	16
1.5. Diagnóstico .....	17
1.6. Tratamiento .....	18
1.7. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	18
1.8. Relevancia clínica .....	19
1.9. Factores de virulencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	20
1.10. Vesículas de la membrana externa (OMV) .....	23
1.11. Funciones de las microvesículas .....	25
1.12. Biogénesis de OMV .....	28
1.13. Respuesta y modulación inmune inducida por las microvesículas .....	31
1.14. Aplicaciones de las OMV .....	34
1.15. Inmunización por vía intraperitoneal .....	38
<b>2. ANTECEDENTES GENERALES</b> .....	40
2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	43
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	45
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	45
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	46
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	46
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
<b>6. DISEÑO METODOLÓGICO: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	47
6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	47
6.2. Cultivo en placa e inoculación de <i>K. pneumoniae</i> .....	48
6.3. Identificación de las OMV en el medio líquido .....	48
6.4. Obtención de las microvesículas .....	48

6.5.	Purificación de las microvesículas.....	49
6.6.	Precipitación de las microvesículas por solvente orgánico .....	49
6.7.	Prueba de esterilidad .....	49
6.8.	Cuantificación por reactivo de Bradford.....	50
6.9.	Inmunización por vía intraperitoneal de ratones BALB/c.....	50
6.10.	Obtención de sueros de los ratones inmunizados .....	51
6.11.	Título de anticuerpos.....	51
6.12.	Isotipificación de Anticuerpos.....	52
6.13.	Análisis estadístico.....	52
7.	RESULTADOS.....	53
7.1.	Identificación de las microvesículas en medio líquido LB .....	53
7.2.	Purificación de las microvesículas.....	53
7.3.	Cuantificación de las microvesículas por el método de Bradford .....	54
7.4.	Protocolo de inmunización.....	55
7.5.	Obtención de sueros hiperinmunes .....	56
7.6.	Cuantificación del título de anticuerpos .....	57
7.7.	Isotipificación de las inmunoglobulinas.....	58
8.	DISCUSION DE RESULTADOS .....	62
9.	CONCLUSIONES .....	73
10.	PERSPECTIVAS.....	74
11.	PRESENTACIONES ACADÉMICAS .....	75
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	77
13.	ANEXOS.....	97
13.1.	ÍNDICE DE TABLAS .....	97
13.2.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	97
13.3.	ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	98
13.4.	ABREVIATURAS.....	98

## RESUMEN

Actualmente, las infecciones intrahospitalarias representan uno de los principales problemas de salud pública, según estimaciones de la OMS en México hay 450,000 infecciones relacionadas con la atención sanitaria y 32 muertes por cada 100,000 habitantes cada año. Una de las bacterias más importantes a la que se le atribuye este tipo de infecciones es *Klebsiella pneumoniae* la cual causa principalmente infecciones en tracto urinario, respiratorio y septicemias. *K. pneumoniae* pertenece al grupo de bacterias Gramnegativas denominado “ESKAPE” caracterizadas por su multidrogorresistencia. A pesar de la relevancia clínica de este microorganismo, hasta la fecha, no existe ninguna vacuna contra *K. pneumoniae* que haya sido autorizada por la FDA o sus equivalentes a nivel mundial, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas alternativas y enfoques terapéuticos que permitan disminuir la incidencia de este tipo de infecciones.

Por otra parte, se ha documentado que las bacterias Gramnegativas, patógenas y no patógenas, producen microvesículas de membrana externa (OMV) *in vivo* e *in vitro* durante el crecimiento bacteriano. Las microvesículas son complejos moleculares con un tamaño entre 20-200 nm de diámetro, secretadas por bacterias y están compuestas por lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa, periplásmicas, citoplasmáticas y lípidos. En su interior se ha comprobado la presencia de componentes bacterianos como: ADN, ARN, lipopolisacárido, proteínas, enzimas y peptidoglucano y algunos otros factores de virulencia. Diversos estudios indican que la secreción de OMV se encuentra relacionada con los mecanismos de patogenicidad y que favorecen la interacción microorganismo-hospedero. No obstante, en *K. pneumoniae* poco se conoce sobre los mecanismos inmunogénicos asociados a la secreción de OMV.

En este trabajo se purificaron e inmunizaron por vía intraperitoneal OMV secretadas a partir de dos cepas de *K. pneumoniae*: “ATCC” y “KpBUAP021” en ratones BALB/c con la finalidad de evaluar su inmunogenicidad. Los resultados obtenidos mostraron que las microvesículas “KpBUAP021” indujeron la producción de anticuerpos de tipo

IgG altamente específicos contra las OMV, específicamente IgG2b e IgG3 y en menor medida IgG1 e IgG2a, lo que indica una activación de una respuesta inmune específica mixta de tipo Th1/Th2 mediada por la inmunidad humoral y celular. El análisis estadístico ANOVA demostró que los datos obtenidos presentan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de inmunoglobulinas por parte de los animales inmunizados con las OMVs de “KpBUAP021” con respecto al suero preinmune y animales inmunizados con las OMVs de “ATCC”.

Conclusiones: estos datos demuestran que las propiedades inmunogénicas intrínsecas de las OMV derivadas de *K. pneumoniae* son potentes inductores de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas por lo que se plantean como excelentes candidatas para el desarrollo de una vacuna experimental profiláctica segura, eficaz y de fácil producción contra infecciones causadas por el patógeno *K. pneumoniae*.

**Palabras clave:**

Microvesículas, *Klebsiella pneumoniae*, vacunas, infecciones intrahospitalarias.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Infecciones intrahospitalarias**

Las infecciones intrahospitalarias (IIH), también conocidas como infecciones nosocomiales, son aquellas que aparecen durante la estancia en un hospital y afectan a diversos grupos de personas, entre los que destacan principalmente personas sanas sin antecedentes de padecimientos relacionados con estas y pacientes hospitalizados inmunocomprometidos (Pujol & Limón, 2013). No obstante, este tipo de infecciones no se limita formalmente a aquellas que son adquiridas en un hospital, por el contrario, también se referencian como infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS o HAI, por sus siglas en inglés) debido a que pueden ser contraídas en todos aquellos espacios donde se brinda atención a la salud como centros de rehabilitación o en clínicas y laboratorios de diagnóstico (Haque *et al.*, 2018).

Así mismo, pueden ser definidas como "toda enfermedad microbiológica clínicamente reconocible que afecta al paciente, como consecuencia de su ingreso en el hospital o de su asistencia para el tratamiento, o al personal del hospital como consecuencia de su trabajo, cuya sintomatología aparece mientras el afectado está en el hospital" (Al-Tawfiq & Tambyah, 2014; Dancer, 2014; Haque *et al.*, 2018). Estas infecciones se desarrollan durante el tratamiento y atención a la salud y traen como consecuencia la aparición de enfermedades y un aumento significativo de muertes de los pacientes, de hecho, se consideran como la principal causa de muerte prevenible en pacientes hospitalizados, además, prolongan las estancias hospitalarias que resultan en intervenciones diagnósticas y terapéuticas no previstas en el tratamiento previamente establecido, lo que conlleva a la generación de costos adicionales a los ya incurridos por la enfermedad subyacente del paciente (Hughes, 2008).

De forma general, se puede mencionar que las IAAS de mayor relevancia y monitoreo por parte de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) son las relacionadas con dispositivos invasivos o procedimientos quirúrgicos



e incluyen principalmente infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la línea central (CLABSI), del tracto urinario asociadas a catéter (CAUTI), neumonía asociada a ventilador (VAP), así como infecciones del sitio quirúrgico (SSI) (Al-Tawfiq & Tambyah, 2014; Boev & Kiss, 2017).

De manera retrospectiva, para el año 500 a.C. en todo el mundo civilizado ya existían los hospitales que brindaban cuidado a los enfermos, principalmente en la India, Egipto, Palestina y Grecia (Selwyn, 1991). El inicio formal de las infecciones intrahospitalarias se remonta a las primeras etapas del desarrollo de los hospitales en el año 325, cuando estos son creados como expresión de caridad cristiana para los enfermos (Nodarse, 2002). Durante más de 1000 años los hospitales atendieron a toda clase de pacientes en sus salas y como resultado las epidemias existentes en ese entonces como tifus, cólera, viruela, fiebre tifoidea y puerperal, por mencionar algunas, fueron introducidas y propagadas entre los enfermos (Nodarse, 2002).

Desde la primera mitad del siglo XVIII hasta la “era bacteriológica” el estudio científico de las infecciones hospitalarias o ‘nosocomiales’ del latín tardío 'nosocomialis' que significa “originario del hospital” y que deriva del griego 'nosokonos' donde 'nosos', es enfermedad y 'komein' es cuidar, ha archivado algunas de las aportaciones más notables (Selwyn, 1991).

Con la evolución de la humanidad y el desarrollo de nuevos conocimientos se comenzaron a implementar diversas medidas que permitieron un control parcial del avance de estas enfermedades. Entre los hombres que destacaron por sus aportes al conocimiento en las etapas iniciales de las IIH se puede mencionar a Sir John Pringle, quien en la década de 1740 hizo las primeras observaciones importantes sobre las infecciones adquiridas en hospitales, mientras era médico del ejército británico. Pringle, quien actualmente es conocido como el “padre de la medicina militar”, implementó en hospitales militares diversas reformas sanitarias que tenían como objetivo mejorar la salud, remediando los males asociados al hacinamiento y la mala ventilación, con la finalidad de prevenir la propagación de infecciones. En su trabajo más importante publicado en 1752, “*Observations on the diseases of the*

*army in Camp and Garrison*” declaró que, entre las principales causas de enfermedad y muerte en el ejército, se encontraba el hospital mismo (Pringle, 1752). En una edición posterior de esta obra publicada en el año de 1973, incluyó las descripciones de los experimentos que realizó con “sustancias sépticas y antisépticas” donde probó la capacidad de estas para prevenir la putrefacción de diversos medios con materiales orgánicos, siendo el pionero del establecimiento de la noción de antiséptico. Pringle también favoreció la teoría del “contagio animado” como responsable de las infecciones nosocomiales, es decir, de la “teoría microbiana de la enfermedad” como se conoce en la actualidad (Nodarse, 2002; Pringle, 1752; Selwyn, 1991).

A mediados de la década de 1830, James Young Simpson demostró que la mortalidad era proporcional al tamaño de los hospitales y al grado de hacinamiento. Asimismo, realizó comparaciones de la tasa de mortalidad por gangrena e infección, presentadas después de una amputación entre pacientes ambulatorios y hospitalizados, encontrando que estos últimos presentaban un mayor número de muertes. Simpson hizo uso del término “hospitalismo” para referirse a las IAAS sugiriendo que el cuidado hospitalario podría significar un riesgo de infección a los pacientes (Selwyn, 1991; Wiltshire, 1870).

Años más tarde, los conocimientos aportados por Joseph acerca del papel de las bacterias en la sepsis quirúrgica y su demostración de que esta se podía evitar eliminando a las bacterias de una herida quirúrgica, sustentaron los principios de la cirugía antiséptica. En su publicación de 1867 en “The Lancet” sustentó que el uso del ácido carbólico o fenol como antiséptico para lavar el instrumental, las manos de los cirujanos y las heridas abiertas, podía ejercer un efecto destructivo sobre los microorganismos causantes de las infecciones hospitalarias, incluso diseñó un pulverizador con el fin de realizar la aerolización de los quirófanos, lo que disminuyó drásticamente la mortalidad de los pacientes quirúrgicos por infecciones (Lister, 1876; Nodarse, 2002; Selwyn, 1991).

En nuestro días, diversos estudios de la etiología de estas infecciones han permitido conocer con exactitud todos aquellos factores que favorecen la aparición de estas

infecciones y que en su mayoría están relacionados con el entorno clínico donde se incluyen también factores ambientales relacionados con las instalaciones e incluso factores ligados a los pacientes, el personal y visitantes. Estos abarcan transmisión por el personal médico u otras personas del hospital en cuyo caso se reconoce como infección cruzada; la utilización de equipos, instrumentos y dispositivos invasivos contaminados, entre los que destacan aquellos asociados a ventilación mecánica o sondaje uretral; el ingreso de microorganismos oportunistas después de una cirugía o procedimiento que compromete la barrera cutánea como infección de las incisiones quirúrgicas o lesiones de la piel y de las membranas mucosas; inhalación de aerosoles infectados, la diseminación hematológica a partir de otro foco de sepsis, a través de las intervenciones diagnósticas, quirúrgicas y terapéuticas; el uso inapropiado o tratamientos prolongados de terapias antimicrobianas e inclusive aquella atribuida a microorganismos transportados por el paciente antes de la aparición de la enfermedad adquirida en el hospital, es decir, autoinfección (Parker, 1978; Salazar, 2012; Zamora *et al.*, 2015).

Por su parte, existe una gran variedad de microorganismos responsables de los diferentes tipos de IAAS entre los que destacan principalmente las bacterias, al ser microorganismos multidrogosresistentes (MDRO) como enterococos resistentes a la vancomicina (VRE, por sus siglas en inglés), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés), *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenémicos, *Mycobacterium tuberculosis* y algunas bacterias Gram negativas como *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli* las cuales han sido estudiadas debido a su prevalencia en los hospitales, además de que presentan una mayor resistencia a las terapias con antibióticos, algunos virus como los norovirus y hongos o parásitos fúngicos los cuales varían entre las diferentes poblaciones de pacientes, las instalaciones médicas y el entorno en el que se brinda atención (Al-Tawfiq & Tambyah, 2014; Dancer, 2014; Khan *et al.*, 2017; Suleyman *et al.*, 2018).

## **1.2. Resistencia a antibióticos**

Uno de los principales tratamientos que se ha implementado para las infecciones nosocomiales, específicamente en aquellas que derivan de la exposición a agentes patógenos bacterianos, ha sido tratamiento con antibióticos, mismo que ha logrado reducir considerablemente la mortalidad atribuida a estas enfermedades infecciosas (WHO, 2002). Por consiguiente, junto con las infecciones nosocomiales se presenta otra de las problemáticas de alerta a nivel mundial: la resistencia a antibióticos desarrollada por las bacterias causantes de estas.

Hoy en día, el uso no conmensurado y tratamientos prolongados con antibióticos ha traído como consecuencia la potenciación del desarrollo de cepas multirresistentes lo que se traduce en graves problemas para el sistema sanitario que se reflejan en un aumento considerable de costos y mortalidad de los pacientes hospitalizados (Chávez-Jacobo, 2020; WHO, 2002).

En el año 2009 fue introducido el término “ESKAPE” por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA), mismo que hace referencia a los patógenos como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter species* cuya importancia se debe a su elevada incidencia en las IIH (Arias-Flores *et al.*, 2016; Benkó *et al.*, 2020; Cardo *et al.*, 2010; Miró-Canturri *et al.*, 2019). Con el casi nulo descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha decretado a la resistencia antimicrobiana como uno de los principales problemas del siglo XXI (Miró-Canturri *et al.*, 2019; Munita & Arias, 2016).

## **1.3. Epidemiología e infecciones nosocomiales en México**

Las IAAS ocurren en los centros de salud en todo el mundo. Se estima que en cualquier momento, más de 1,4 millones de personas a nivel mundial padecen infecciones contraídas en hospitales (WHO, 2005). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, por cada 100 pacientes al menos 7 en países desarrollados y

10 en países en desarrollo, adquirirán al menos una IAAS además de que al menos el 15% de los pacientes hospitalizados padecerán estas infecciones (Danasekaran *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2017).

El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) estimó en 2015, que alrededor de 4 millones de pacientes son afectados cada año en Europa y como consecuencia de esto, se generan alrededor de 16 millones de días adicionales de estadía hospitalarias. Aunado a lo anterior, se reporta que las pérdidas financieras anuales se aproximan a los 7 mil millones de euros. Por otro lado, el ECDC reporta que existe una prevalencia del 7,1 % de estas infecciones en los países europeos (WHO, 2016)

En lo que respecta a Estados Unidos de América (EE.UU.), en 2002 se estimó que la tasa de incidencia de las HAI fue de aproximadamente 4,5% y se reportaron alrededor de 1,7 millones de pacientes afectados (WHO, 2016). Asimismo, se estima que el costo anual en los hospitales de las IAAS oscila entre \$36 y \$45 mil millones de dolares (Rennert-May *et al.*, 2018). Para el año 2014 una encuesta multiestatal en este mismo país, estimó la prevalencia en hospitales de cuidados intensivos reportando 648 mil pacientes con IAAS y que en un día determinado, al menos 1 de cada 25 pacientes hospitalizados presentaba al menos un IAAS. Además, alrededor de 75 mil pacientes que presentaron una infección de naturaleza nosocomial fallecieron durante su hospitalización (Magill *et al.*, 2014). No obstante el CDC (2019-2020) reporta que “a nivel nacional, en los hospitales hubo una disminución estadísticamente significativa del 5 al 11% en casos relacionados con infección por *Clostridioides difficile* y “SSI”. Por su parte, no se reportaron cambios significativos en CAUTI pero sí aumentos significativos en VAP (35 %), CLABSI (24 %) y MRSA (15 %) entre los años 2019 y 2020 (CDC, 2020).

En Canadá, se prevé que aproximadamente 200 mil pacientes desarrollarán IAAS cada año y que más de 8 mil pacientes mueren como resultado de estas infecciones (Zoutman *et al.*, 2003). En el último informe publicado por el Canada Communicable Disease Report (CCDR) se reporta que entre el año 2013 y 2017 las infecciones por *C. difficile* adquiridas en hospitales disminuyeron en un 25%, mientras que las

infecciones de origen nosocomial por VRE aumentaron en un 24% a diferencia de las infecciones por MRSA que disminuyeron un 6% (CCDR, 2019).

Simultáneamente, se reporta que en los países en desarrollo, el riesgo de contraer infecciones nosocomiales es entre 2 y 20 veces superior en comparación con los países industrializados y que en algunos de estos, los pacientes afectados pueden superar hasta un 25%. A su vez, la prevalencia de IAAS en los nosocomios y centros de atención médica en estos países, se encuentra entre un 5.7% y 19,1%, mientras que la prevalencia en los países desarrollados va desde 3,5% hasta el 12% (WHO, 2016).

Acorde a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, en México hay 450,000 infecciones relacionadas con la atención de la salud y 32 muertes por cada 100,000 habitantes cada año, sus costos médicos anuales se acercan a los 32 mil millones de pesos (US \$1,500 millones) (WHO, 2005). Por otro lado, algunos informes muestran que la prevalencia de las infecciones puede llegar al 21% de los casos hospitalizados, o incluso al 23% en la unidad de cuidados intensivos (Castañeda & Valdespino, 2015). Estas cifras duplican o triplican los estándares internacionales definidos para este tipo de infecciones (Rodríguez Salgado, 2018).

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), está encargada de la vigilancia de las IAAS. Esta red aporta y establece los indicadores que permiten tener acceso a la información necesaria para la evaluación y seguimiento epidemiológico de las IAAS en el país.

La RHOVE cuenta con una NOM: NOM-045-SSA2-2005 la cual establece los criterios que deben ser seguidos por todas las instituciones de atención que prestan servicios médicos tanto de sectores público, social y privado del Sistema Nacional de Salud para la prevención, vigilancia y control epidemiológicos de las infecciones nosocomiales que afectan la salud de la población usuaria de los servicios médicos prestados por los hospitales (Secretaría de Salud, 2009). Sin embargo, en 2015, las unidades adscritas fueron 385, de las cuales solamente 378 realizaron al menos una captura durante el año. Esto equivale al 8.5% de las unidades hospitalarias registradas en ese mismo año (Rodríguez Salgado, 2018).

Según el informe de 2015 de la RHOVE, las principales IAAS notificadas por las instituciones de salud en el país fueron bacteriemia, neumonía e infecciones de vías urinarias como se muestra en la tabla I.

**Tabla I. Principales IAAS registradas en las instituciones hospitalarias de la RHOVE en 2015.**

Tipo de infección	Total de hospitales	Porcentaje
Bacteriemia	14,856	24.0
Neumonía	12,851	20.7
Infección de vías urinarias	9,750	15.7
Infección de sitio quirúrgico	9,301	15.0
Otras <sup>1</sup>	15,211	24.6

<sup>1</sup>Incluye: infección del sitio de inserción del catéter, infecciones de piel y tejidos blandos, conjuntivitis, gastroenteritis, infección de úlceras de decúbito, entre otras. **Modificada de Rodríguez Salgado,**

De acuerdo con lo reportado en el informe de la Dirección General De Epidemiología (DGE) en conjunto con la Secretaría de Salud y la RHOVE en 2016 de las 61,969 IAAS notificadas en el 56.3% de ellas se logró realizar la identificación del agente etiológico donde destacan *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* tal y como se muestra en la tabla II (DGE & SSA, 2016).

**Tabla II. Principales agentes etiológicos identificados como agentes causales de las IAAS en las instituciones hospitalarias adscritas a la RHOVE en 2015.**

Agente etiológico	Total de casos	Porcentaje %
<i>Escherichia coli</i>	6,550	18.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,342	12.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,310	9.5
Otros	12,098	34.7

Modificada de DGE & SSA, 2016.

Aunado a lo anterior, en el mismo reporte se desglosan algunas de las infecciones nosocomiales con mayor incidencia entre la población mexicana, así como los principales agentes etiológicos aislados de estas.

**Tabla III. Principales microorganismos patógenos aislados de infecciones nosocomiales reportados a la RHOVE.**

Sitio	Microorganismo patógeno	Porcentaje (%)
Neumonía	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20%
	<i>Pseudomonas Spp</i>	15%
Infección de herida superficial	<i>E. coli</i>	32%
	<i>P. aeruginosa</i>	21%
	No se aisló	26%
Infección de herida profunda	<i>E. coli</i>	25%
	<i>S. aureus</i>	25%
	No se aisló	17%
Infecciones de vías urinarias	<i>E. coli</i>	42%
	<i>S. aureus</i>	12%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8%
	No se aisló	21%
Bacteriemia primaria	<i>E. coagulasa negativo</i>	19%
	<i>S. marcescens</i>	19%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15%

Modificada de DGE & SSA, 2016.

En conjunto, todos estos datos evidencian que la incidencia de las IAAS a nivel mundial es cada vez mayor, además de que siguen siendo una de las causas de mortalidad más importantes. No obstante, muchos países aún carecen de un sistema de vigilancia que permita un control y monitoreo constante de este tipo de infecciones por lo que estas, a pesar de ser prevenibles, aun representan un grave problema de salud pública, principalmente en los países en desarrollo.

Las bacterias Gramnegativas son responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales, incluidas la neumonía, las infecciones del tracto urinario, las infecciones intraabdominales, además, son una causa importante de infecciones del torrente sanguíneo. En los últimos años, las infecciones nosocomiales causadas por bacterias Gramnegativas resistentes a una amplia gama de antibióticos como *E.*



*coli*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* han presentado una tendencia ascendente. De hecho, en concordancia con el último informe de las unidades RHOVE, en el año 2016, los patógenos más comunes en la neumonía asociada a ventilación mecánica fueron bacilos Gramnegativos, que se reportaron en más de 60% de los casos y donde destacaron por su frecuencia *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *K. pneumoniae* (DGE & SSA, 2016; Rodríguez Salgado, 2018).

A pesar de los esfuerzos para reducir la incidencia de las IAAS, en la actualidad existen diversas problemáticas que se deben afrontar para reducirlas, como la creciente cifra de pacientes que presentan comorbilidades y pacientes inmunodeprimidos, la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, las prolongadas estadías de los pacientes que aumenta significativamente el riesgo de contraer una infección, la utilización de dispositivos así como de procedimientos invasivos, además de las infecciones micóticas y virales subyacente exigen el surgimiento de nuevas terapias antimicrobianas, vacunas profilácticas y una aplicación estricta de las medidas de prevención que en conjunto busquen mitigar significativamente la aparición y propagación de las IAAS a nivel mundial.

#### **1.4. Enterobacterias**

La familia *Enterobacteriaceae*, son un grupo de bacilos Gramnegativos, algunos forman parte de la microbiota normal del humano y de animales. Esta familia comprende diversos géneros entre los que se encuentran: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, entre otros, siendo *E. coli* la más común en la microbiota normal de los hospederos. Los géneros con las especies más virulentas incluyen *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Yersinia* (Jameson, 2018; Ryan, 2017).

Los componentes de su superficie celular, como los antígenos O de los lipopolisacáridos, los antígenos capsulares K y los antígenos flagelares H son relevantes debido a que desempeñan funciones en la patogénesis de las infecciones bacterianas. Además, estas bacterias tienen la capacidad de producir y

liberar diversas toxinas y factores de virulencia al medio extracelular ( Riedel, 2020; Rojas, 1995; Romero & Iregui, 2010).

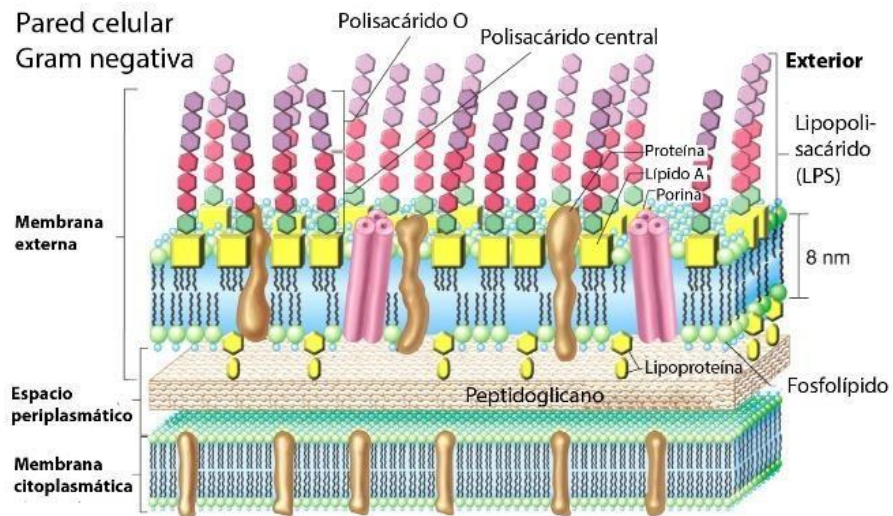


Figura 1. Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gramnegativas. Modificada de Bertrand, 2013.

## 1.5. Diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones nosocomiales en el paciente permite plantear un esquema terapéutico eficaz que permita el tratamiento y eliminación del proceso patológico. En la actualidad, el cultivo de las enterobacterias a partir de muestras de orina, sangre, pus, líquido cefalorraquídeo, esputo u otro material orgánico, proveniente del paciente infectado, en placas con medios diferenciarles, selectivos y enriquecidos es el principal método para el diagnóstico, ya que permite una rápida identificación preliminar de estas bacterias. Más aún, en conjunto con otras técnicas donde se incluyen antibiogramas y pruebas bioquímicas, hacen posible la identificación más específica del microorganismo causal (Jameson, 2018; Riedel, 2020; Ryan, 2017).

En los últimos años, han surgido nuevas técnicas más sensibles que han logrado mejorar el diagnóstico como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite el análisis directo de ácidos nucleicos para la detección de genes de toxinas,

adhesinas o invasinas y las técnicas de inmunodiagnóstico, permitiendo así la identificación más rápida y precisa de las bacterias patógenas (Jameson, 2018).

## **1.6. Tratamiento**

Actualmente existe un número limitado de agentes antimicrobianos efectivos contra los microorganismos Gramnegativos multirresistentes. Generalmente, el tratamiento para las infecciones causadas por este tipo de bacterias se basaba en la utilización de antimicrobianos de amplio espectro. No obstante, estas presentan una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles debido a que han desarrollado diversos mecanismos de adaptación frente a la presencia de estas sustancias (Jameson, 2018; Riedel, 2020; Ryan, 2017).

De manera general, los mecanismos de resistencia consisten en: la inactivación del antibiótico por la producción de enzimas, como las betalactamasas adquiridas por mecanismos de transferencia horizontal de elementos genéticos móviles como plásmidos; mutaciones en los sitios de acción de los antibióticos; alteraciones en la permeabilidad de las porinas y bombas de eflujo que eliminan a los antibióticos de la célula por medio de proteínas de membrana (Daza, 1998; Salgado *et al.*, 2015).

Y aunque los carbapenémicos fueron considerados por décadas como los agentes antimicrobianos más eficaces contra estos patógenos, el reciente aumento en la propagación de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) derivado del uso excesivo de algunos antibióticos betalactámicos de amplio espectro ha reducido las opciones disponibles de terapias antimicrobianas, aumentando drásticamente la necesidad de redescubrir, introducir nuevos antibióticos o desarrollar nuevos tratamientos basados en la combinación de antibióticos con actividad disminuida (Bassetti *et al.*, 2019; Bassetti & Righi, 2015; Doi, 2019).

## **1.7. *Klebsiella pneumoniae***

Es una bacteria Gramnegativa, descrita por primera vez por Carl Friedlander en 1882 y forma parte de la familia de las Enterobacterias (Ashurst & Dawson, 2022). Su morfología sigue las características anteriormente descritas, pero al igual que todas las bacterias que componen a esta familia, tiene diversas particularidades. *K. pneumoniae* se caracteriza por tener una morfología de bacilo, descrita como no móvil, sin embargo, en un estudio realizado por Carabarin-Lima y colaboradores se demostró la presencia de un flagelo polar el cual le proporciona movilidad (Carabarin-Lima *et al.*, 2016). Es anaerobia facultativa, se encuentra como células individuales y posee cápsula. En cultivos, que comúnmente se realizan sobre placas de agar chocolate o agar sangre, sus colonias se caracterizan por ser grandes y mucoides, así mismo fermenta lactosa y produce colonias ácidas, de color rosa en agar de MacConkey, y comúnmente produce pruebas positivas para lisina descarboxilasa y citrato (Riedel, 2020).

Las especies del género *Klebsiella*, llamado así en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs, son ubicuas debido a que tienen una gran capacidad de adaptarse a diferentes nichos ecológicos y hospederos de diferentes especies. Aunado a esto, puede encontrarse ampliamente distribuida en diferentes hábitats como aguas residuales o plantas. Esta bacteria es un patógeno oportunista, común en humanos y otros animales, colonizando las mucosas principalmente. La microbiota nasofaríngea y, especialmente la del tracto gastrointestinal, son los reservorios de esta bacteria (Arenas *et al.*, 2009; Bagley, 1985).

En humanos, la prevalencia de colonización en el colon por *K. pneumoniae* oscila entre un 5% y 35%, mientras que en la bucofaringe, sistema respiratorio y en las heces es del 1% al 5%; frecuentemente, la piel se coloniza únicamente de manera transitoria (Echeverri & Cataño, 2010; Jameson, 2018; Riedel, 2020).

### **1.8. Relevancia clínica**

*K. pneumoniae* es uno de los principales patógenos responsables de causar infecciones intrahospitalarias, debido a que coloniza las mucosas y la piel de pacientes hospitalizados, ocasionando infecciones del tracto respiratorio e

infecciones en vías urinarias. Actualmente, se han descrito dos variantes de *K. pneumoniae*: la clásica (cKpn) conocida como el patotipo etiológico responsable de infecciones en el tracto urinario, neumonía, bacteriemia y sepsis en pacientes inmunocomprometidos y *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKpn) descubierta a mediados de la década de 1980 en Taiwán y causa infecciones invasivas como: abscesos prostáticos, hepáticos, pulmonares, renales y óseos seguidos por el desarrollo de metástasis o diseminación a otros órganos que puede o no incluir bacteriemia secundaria (Catalán-Nájera *et al.*, 2017; Jameson, 2018; Zhu *et al.*, 2021).

De hecho, las especies de *Klebsiella*, donde destaca *K. pneumoniae*, se encuentran entre las 10 bacterias más patógenas causantes de este tipo de infecciones, además de que se clasifica como uno de los géneros bacterianos con mayor resistencia a los antimicrobianos, resultado de la adquisición de plásmidos codificantes para carbapenemasas y BLEE, que le confieren resistencia a las cefalosporinas, fluoroquinolonas, clotrimoxazol, aminoglucósidos y antibióticos carbapenémicos (Li *et al.*, 2014; Riedel, 2020; Ryan, 2017).

### **1.9. Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae***

Los factores de virulencia han sido bien caracterizados y los que contribuyen a la patogenia de *K. pneumoniae* son principalmente cuatro e incluyen: cápsula, LPS, fimbrias y sideróforos (Paczosa & Meccas, 2016; Zhu *et al.*, 2021).

Algunos otros factores han sido recientemente identificados e incluyen proteínas de la membrana externa (OMP), porinas, bombas de expulsión, sistemas de transporte de hierro, producción de citotoxinas, enterotoxinas y hemolisina. Sin embargo, estos no han sido completamente caracterizados. además de que se cree presentan un papel menor en la patogénesis de *Klebsiella* (Paczosa & Meccas, 2016; Podschun & Ullmann, 1998).

*K. pneumoniae* posee una capsula formada por polisacáridos que recubre los antígenos somáticos (O y H) y es identificable mediante la prueba de Quellung (Jameson, 2018; Ryan, 2017). La cápsula es el factor de virulencia más estudiado

de *K. pneumoniae*. Esta le brinda protección a la bacteria contra la fagocitosis por granulocitos polimorfonucleares, evita que esta bacteria sea internalizada y procesada para la presentación antigénica, contribuye a la resistencia contra el complemento y evita la destrucción de la bacteria por factores séricos inhibiendo la activación o captación de componentes del complemento, especialmente C3b. Hasta la fecha se han identificado alrededor de 78 serotipos capsulares para *K. pneumoniae*. De los cuales, los serotipos K1, K2, K4 y K5 son generalmente más virulentas en comparación con otros serotipos, además K1 y K2 presentan una mayor resistencia a la fagocitosis y muerte intracelular por macrófagos alveolares y neutrófilos. Por su parte K2 es el tipo más frecuente aislado en el ámbito clínico y se encuentra comúnmente en aislados de pacientes con UTI, neumonía o bacteriemia. Las cepas hvKpn pueden producir una hipercápsula, conocida como hipermucoviscosa, que contribuye significativamente en la patogenicidad de esta bacteria y tiende a ser de mayor grosor en comparación con la de la cepa cKpn (López-Vargas & Echeverri, 2010; Paczosa & Meccas, 2016; Podschun & Ullmann, 1998; Zhu *et al.*, 2021).

El proceso infeccioso por parte de *Klebsiella* comienza con su adherencia a las células del hospedero a través de pilis, también como fimbrias, ubicados en la superficie bacteriana, de los cuales existen dos tipos predominantes en *Klebsiella spp*: el tipo 1 y el tipo 3. Las fimbrias son las principales estructuras adhesivas que se han caracterizado como factores de patogenicidad. Su relevancia en la patogénesis bacteriana se atribuye a que permiten la unión de la bacteria con las mucosas, así como a las células epiteliales de los tractos urogenital, respiratorio e intestinal, mediando la colonización bacteriana en estos compartimentos anatómicos. A su vez, pueden participar en la formación de biopelículas y la unión a superficies abióticas como catéteres permanentes u otros dispositivos médicos. El tipo 1, esta principalmente asociado a las infecciones del tracto urinario, mientras que el tipo 3 interviene en la adherencia a las células endoteliales y en los epitelios del tracto respiratorio y urinario. Las fimbrias de tipo 1 también son capaces de unirse a glicoproteínas solubles en la orina o en la saliva, además de expresarse en el 90% de los casos clínicos (Hornick *et al.*, 1992; Iwahi *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2014; Paczosa & Meccas, 2016; Podschun & Ullmann, 1998).

En lo que respecta al LPS, es un importante factor de virulencia que protege a *K. pneumoniae* contra las defensas humorales, debido a que a través del antígeno O, evita la muerte de la célula bacteriana mediada por complemento. Las cadenas laterales de este antígeno pueden atravesar la capa capsular y quedar expuestas al medio extracelular provocando que C3b se fije a sus cadenas laterales más largas lo que provoca que C3b se una lejos de la membrana bacteriana previniendo así la formación del complejo de ataque a membrana. No obstante, el LPS también puede ser un fuerte activador inmunológico capaz de activar el complemento. El lípido A, es un ligando del receptor tipo Toll-4 (TLR4), al ser estimulado conduce a la producción de citocinas que reclutan y activan las respuestas celulares, incluidos los neutrófilos y los macrófagos, capaces de eliminar la infección por *K. pneumoniae*. Es por ello por lo que algunas cepas de *K. pneumoniae* protegen a los LPS con la capsula, evitando así que estos sean reconocidos por este tipo de receptor. A diferencia de antígenos K, en *K. pneumoniae* solo se han identificado 9 tipos de antígenos O siendo O1 el más común en los aislamientos clínicos (Li *et al.*, 2014; Paczosa & Mecsas, 2016; Podschun & Ullmann, 1998; Zhu *et al.*, 2021).

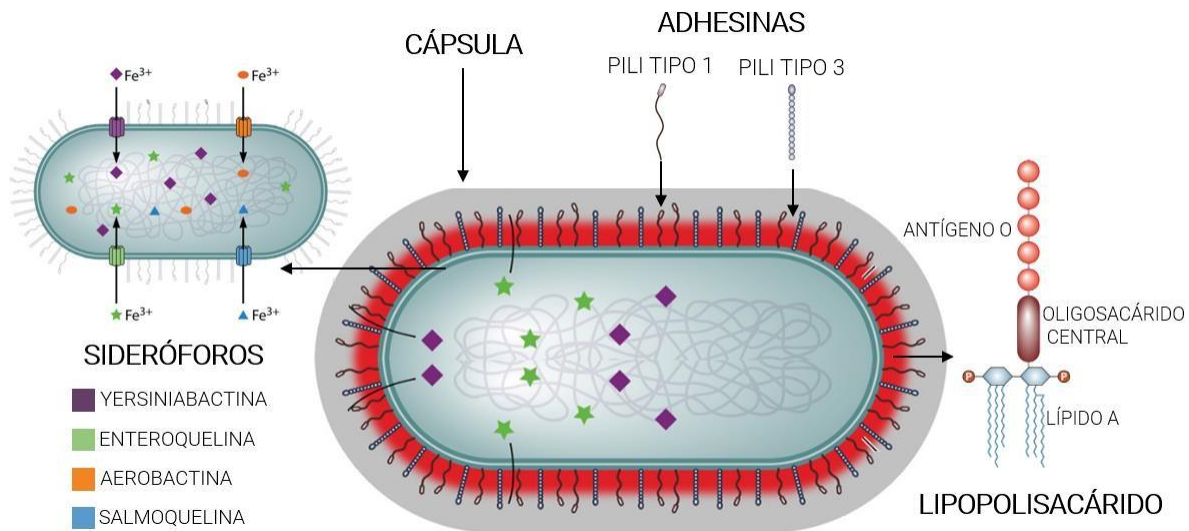


Figura 2. Factores de virulencia presentes en *Klebsiella pneumoniae*. Modificada de Paczosa & Mecsas, 2016.

Finalmente, una de las estrategias más utilizadas por parte de muchos patógenos, incluido *K. pneumoniae*, para asegurar su suministro de hierro en el hospedero es

la secreción de sideróforos. Estos son moléculas que se sintetizan dentro de las bacterias para posteriormente ser secretados al medio extracelular donde se unen al hierro para luego transportarlo de regreso a la célula. El hierro es un factor esencial en el crecimiento bacteriano, a pesar de ello, es un recurso limitado ya que se encuentra unido intracelularmente a proteínas como la hemoglobina, la ferritina, la hemosiderina y la mioglobina, y extracelularmente a proteínas fijadoras de hierro de alta afinidad como la lactoferrina y transferrina. Es por ello que los sideróforos al poseer una mayor afinidad por el hierro son capaces de captarlo de forma competitiva con estas proteínas. La producción de más de un sideróforo por *K. pneumoniae* representa una de las estrategias que permite optimizar la colonización en diferentes tejidos, además de que evita la neutralización de un sideróforo por parte del huésped. La cepa hvKP produce cuatro sideróforos diferentes incluyendo la enterobactina también conocida como enteroquelina, yersiniabactina, salmoquelina y aerobactina, siendo la enterobactina la de mayor afinidad (Holden *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Paczosa & Meccas, 2016; Podschun & Ullmann, 1998; Sah *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2021).

Aunado a todo lo anterior, *K. pneumoniae* es capaz de secretar naturalmente LPS, proteínas y en los últimos años se ha detectado la secreción de vesículas de membrana externa (OMV, por sus siglas en inglés), también llamadas microvesículas, al medio extracelular durante sus diferentes etapas de crecimiento y desarrollo bacteriano tanto *in vitro* como *in vivo*.

#### **1.10. Vesículas de la membrana externa (OMV)**

Las bacterias Gramnegativas patógenas y comensales tienen la capacidad de producir vesículas de la membrana externa (OMV), también conocidas como microvesículas, como subproductos de su crecimiento natural microbiano. No obstante, diversos estudios apuntan a que la secreción de estas microvesículas corresponde a un mecanismo de secreción de una gran variedad de factores de virulencia separados de la célula bacteriana, entre los que se incluye la resistencia a antibióticos. Estas son ampliamente estudiadas debido a que contribuyen a la



patogénesis bacteriana mediante el tráfico de cargo molecular desde las membranas bacterianas hasta las células diana, que pueden ser otras células bacterianas así como células eucariotas, en la interacción hospedero-patógeno (Lee *et al.*, 2012).

Las OMV, son liposomas esféricos que varían de aproximadamente 20 nm a 250 nm de tamaño. Estas son complejos moleculares que poseen una membrana bicapa que consiste principalmente de lipopolisacáridos, antígenos de superficie de la bacteria que los secreta, proteínas de la membrana externa, proteínas y componentes periplasmáticos, lípidos, e incluso proteínas citoplasmáticas. Diversos análisis en torno a estas microvesículas, han comprobado que dentro de ellas se contienen diversos componentes bacterianos, principalmente algunos factores de virulencia, entre los que destacan ADN, ARN, LPS, proteínas, enzimas como proteasas,  $\beta$ -lactamasas, fosfatasas ácidas,  $\beta$ -glucuronidasas, lipasas, ureasas, celulasas y quitinasas, proteínas chaperonas como Hsp 60, toxinas, fimbrias y peptidoglucano (Anand & Chaudhuri, 2016; Ellis & Kuehn, 2010; Jagannadham & Chattopadhyay, 2015).

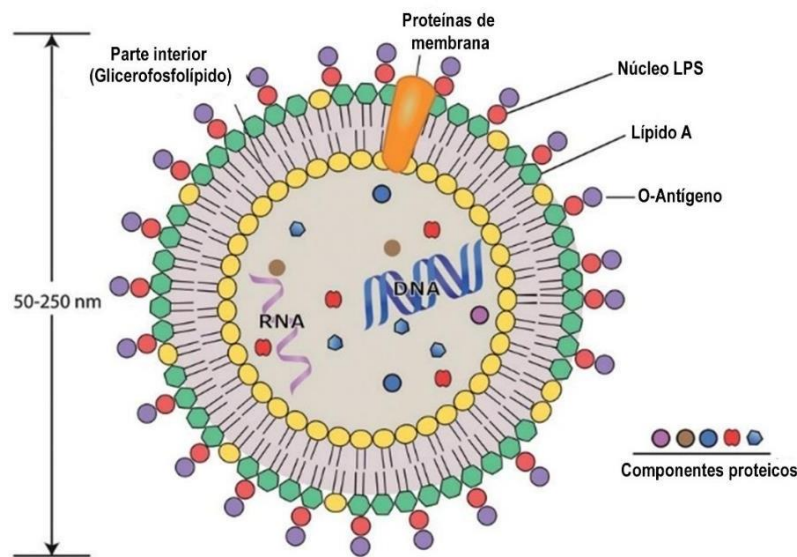


Figura 3. Diagrama esquemático de una vesícula de membrana externa también denominada como microvesícula (OMV) donde se muestran los diferentes componentes que conforman su envoltura donde destaca el LPS, el antígeno O y el contenido localizado en su interior: proteínas, ADN bicatenario, ARN, plásmidos, enzimas, entre otros. Modificada de Anand & Chaudhuri, 2016.

El descubrimiento de las microvesículas se remonta a finales de la década de 1950 cuando DE (1959) en su artículo “Enterotoxicity of Bacteria-free Culture-filtrate of *Vibrio cholerae*” reportó que la inoculación de un filtrado estéril extraído de un cultivo de *Vibrio cholerae* en el lumen del intestino delgado de conejo, mostraba cambios histológicos como edema de la mucosa y/o submucosa además de provocar una respuesta inmune atribuida a la infiltración de la membrana mucosa con linfocitos y ocasionalmente células polimorfonucleares, congestión de los vasos sanguíneos y cierta denudación del epitelio superficial (De, 1959).

Años más tarde, en 1965, las microvesículas fueron detectadas por primera vez en el sobrenadante libre de células de un cultivo de *E. coli* desarrollado en condiciones de crecimiento limitantes de lisina donde se encontró que esta bacteria liberaba cantidades significativas de LPS soluble. Los análisis a través de microscopía electrónica revelaron que en realidad se desprendían pequeñas estructuras esféricas con un centro denso en electrones y que estas vesículas se derivaban de la membrana externa. Poco después, en otros estudios con otras bacterias Gramnegativas, se descubrió que *V. cholerae* liberaba vesículas esféricas que se producían al “pellizcar” la membrana externa (Chatterjee & Chaudhuri, 2011; Haurat *et al.*, 2015; Jagannadham & Chattopadhyay, 2015; Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015; Kulp & Kuehn, 2010).

Si bien, la producción de microvesículas por parte de las bacterias fue considerada en un inicio como resultado del crecimiento o de la lisis de la célula bacteriana, en años más recientes, se ha estudiado su biogénesis así como su funciones en la supervivencia y en la patogénesis bacteriana de las bacterias que las secretan.

### **1.11. Funciones de las microvesículas**

Las microvesículas funcionan como vehículos de secreción, distribución y transporte de una gran cantidad de moléculas que conforman su cargo (adhesinas, toxinas y enzimas), protegiéndolas de degradación frente a las proteasas y anticuerpos del hospedero encontrados en el espacio extracelular. Por la naturaleza de este cargo, las OMV contribuyen a la supervivencia, virulencia y patogenicidad

bacteriana promoviendo la colonización del hospedero (Haurat *et al.*, 2015; Sartorio *et al.*, 2021; van der Pol *et al.*, 2015).

La secreción de las OMV les permite a las bacterias como *K. pneumoniae* establecer interacciones con diferentes células ya que, debido a su pequeño tamaño, estas pueden diseminarse en una amplia zona de su entorno incluso en sitios inaccesibles para la bacteria, sin gastar energía e impartir funciones biológicas que incluyen: la regulación de la expresión génica en respuesta a la señalización del quórum sensing; formación de biopelículas que favorece la supervivencia y brinda protección contra antibióticos, moléculas de complemento y anticuerpos a las bacterias que la conforman; administración de toxinas y compuestos inmunomoduladores; hidrólisis de polisacáridos; adquisición de nutrientes por algunas enzimas como la aminopeptidasa; comunicación intracelular y extracelular; competencia interbacteriana y la transferencia horizontal de genes por plásmidos, fragmentos de ADN cromosómico o ADN de bacteriófagos (Haurat *et al.*, 2015; Jagannadham & Chattopadhyay, 2015; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Kulp & Kuehn, 2010).

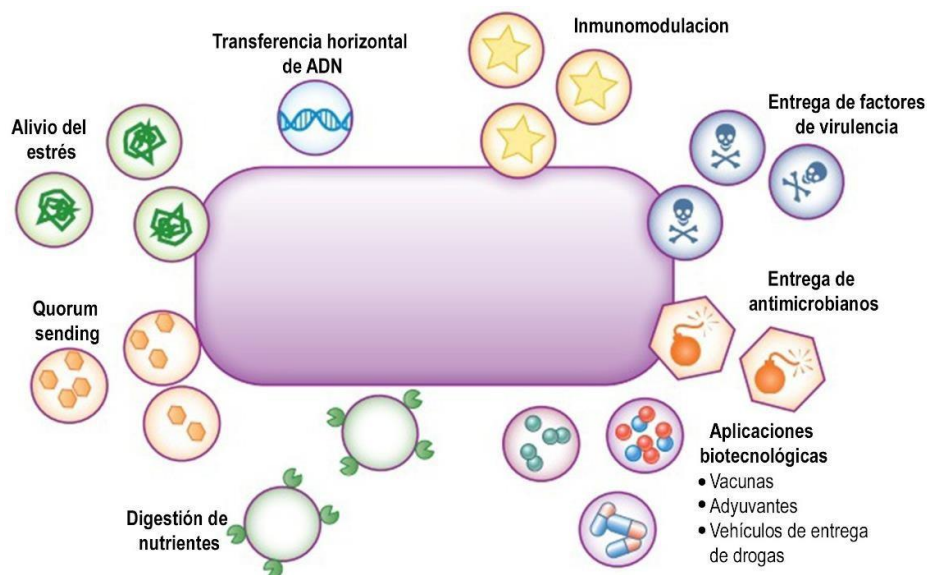


Figura 4. Principales funciones que desempeñan las microvesículas. Modificada de Sartorio, 2021.

Asimismo, uno de los mecanismos de defensa que presentan la bacterias contra moléculas o agentes que atacan su superficie es el aumento en la producción de

OMV. Durante la fijación del fago, la bacteria aumenta la formación de OMV con la finalidad de liberarlo antes de que se inyecte el ADN. Además, las OMV liberadas actúan como señuelo para los fagos que pudieran estar presentes en el ambiente reduciendo así la capacidad de estos para infectar la célula bacteriana. Por otro lado, se ha descrito que las microvesículas participan en la defensa bacteriana contra los antibióticos que atacan las membranas como la colistina ya que, como en la infección por fagos, el aumento en la producción de OMV que actúan como señuelos conduce a la inactivación de la actividad antibiótica posiblemente secuestrando y reduciendo la disponibilidad del antibiótico. Recientemente se reportó que las OMV pueden transportar los antibióticos peptídicos fuera de la célula evitando así que se acumule en la concentración suficiente requerida para su actividad (Anand & Chaudhuri, 2016; Haurat *et al.*, 2015; Jagannadham & Chattopadhyay, 2015; Kulp & Kuehn, 2010; van der Pol *et al.*, 2015).

Del mismo modo, se ha demostrado que la producción de microvesículas aumenta en respuesta al estrés físico: presión osmótica o choque térmico o estrés químico: presencia de concentraciones tóxicas de alcoholes de cadena larga o EDTA que afectan la membrana y algunos otros factores como acumulación de agregados de proteínas o la exposición a agentes que dañan la superficie. Además, las OMV son un medio que le permite a las células bacterianas liberar material tóxico, mal plegado o innecesario como proteínas desplegadas o sobreexpresadas con la finalidad de reducir el estrés de la envoltura (Haurat *et al.*, 2015; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Kulp & Kuehn, 2010).

El mecanismo general de integración de las microvesículas a las células diana consta principalmente de la secreción de estas OMVs por parte de las bacterias parentales. Una vez en el medio extracelular, se adhieren a las superficies de la célula hospedera y, posteriormente, atraviesan la membrana plasmática periférica de las células diana a través de endocitosis para invadir el citosol celular y depositar sus factores de virulencia (Kuehn & Kesty, 2005; Kulp & Kuehn, 2010).

Aunque es bien sabido que las OMV pueden entrar y liberar el cargo dentro de las células hospedera durante la infección, los mecanismos de asociación y captación del hospedero no se comprenden bien.

### 1.12. Biogénesis de OMV

Inicialmente, se pensó que la formación de OMV era un proceso físico asociado con el desgaste de la membrana externa (OM) o que su formación se debía a un crecimiento más acelerado de la OM en comparación con la pared celular y las lipoproteínas asociadas por la pérdida de los enlaces covalentes entre la membrana externa y la capa de peptidoglicano (PG). No obstante, investigaciones más recientes demostraron que la formación de microvesículas es un mecanismo que requiere un gasto energético por lo que se sugirió que su secreción juega un papel importante en la bacteria. De forma general se puede describir la biogénesis de las microvesículas como un proceso que se produce por la expansión y el abultamiento de la OM, seguido del pellizco de la OM para formar vesículas y que concluye con una gemación de estas estructuras esféricas. Es importante mencionar que la composición de la bicapa lipídica de las OMV conserva la asimetría y los componentes observados en la OM bacteriana (Jagannadham & Chattopadhyay, 2015; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Kulp & Kuehn, 2010).

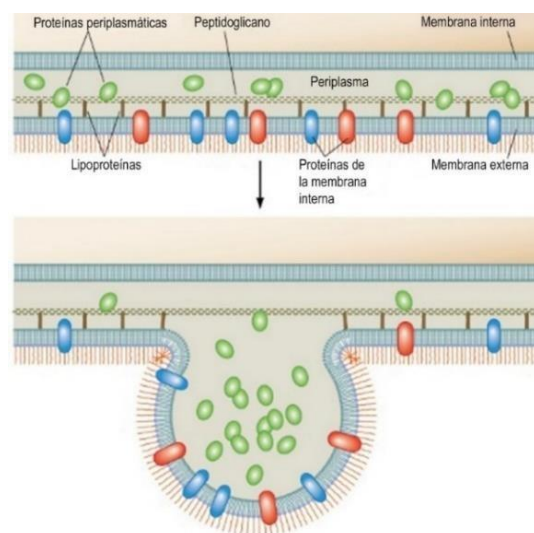


Figura 5. Mecanismo de formación de microvesículas en bacterias Gramnegativas. Modificada de Kulp & Kuehn, 2010.

Los primeros estudios en torno al mecanismo de biogénesis de las OMV propusieron que estas eran generadas por una sobreacumulación de moléculas como fragmentos de peptidoglucano o proteínas mal plegadas en el espacio periplásmico lo que conducía a un abultamiento y ejercía una presión de turgencia sobre la membrana externa, por lo que la célula recurría a la formación de microvesículas para liberarse de esta presión. Asimismo, se propuso que la formación de OMV se debía a una disminución en los enlaces cruzados de OM-peptidoglucano en el sitio de formación de estas (Furuyama & Sircili, 2021; Haurat *et al.*, 2015; Sartorio *et al.*, 2021).

A pesar de que no se ha podido describir un mecanismo universal, en años más recientes se han propuesto diversos modelos que describen la biogénesis de las microvesículas. Estos son: ruptura de las uniones entre la OM y la capa de peptidoglucano (PG), la acumulación excesiva de componentes en el espacio periplásmico, silenciamiento de genes que expresan algunas lipoproteínas como Lpp, OmpA y complejo Tol-Pal involucradas la biogénesis de las microvesículas, por moléculas efectoras, las modificaciones del LPS, remodelación de lipopolisacáridos y el modelo de bicapa-pareja (Anand & Chaudhuri, 2016; Furuyama & Sircili, 2021; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Sartorio *et al.*, 2021; van der Pol *et al.*, 2015). Algunos de los ejemplos más relevantes de estos modelos se describen en la tabla IV.

**Tabla IV. Modelos de estudio de la formación de microvesículas**

Microorganismo de estudio	Descripción del modelo	Referencias
<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> y <i>S. typhimurium</i>	La inactivación de Lpp, proteína encargada de unir la OM a la capa de peptidoglucano, resulta en una mayor producción de OMV.	Haurat <i>et al.</i> , 2015; Sartorio <i>et al.</i> , 2021; Schwechheimer <i>et al.</i> , 2014; Schwechheimer & Kuehn, 2015.
	La eliminación de la proteína OmpA asociada a la capa de peptidoglucano induce una hipervesiculación.	Avila-Calderón <i>et al.</i> , 2021; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Kulp & Kuehn, 2010.

<i>H. pylori</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. boydii</i>	Los mutantes con delección de Tol-Pal mostraron mayores tasas de formación de OMV por alteraciones en la integridad de la membrana.	Bernadac <i>et al.</i> , 1998; Jagannadham & Chattopadhyay, 2015; Yeh <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2021.
El complejo Tol-Pal, que participa en la división celular, captación de sideróforos y fagos de ADN, consta de cinco proteínas: TolA, TolB (que interactúa con Lpp, OmpA y Pal), TolQ, TolR y Pal promoviendo la estabilidad de la membrana (Anand & Chaudhuri, 2016).		
<i>P. gingivalis</i>	Mutantes que carecen de autolisina acumulan fragmentos de peptidoglicano ya que no pueden degradarlos en ausencia de esta enzima lo que conduce a una acumulación de estos y por ende a una mayor producción de OMV.	Avila-Calderón <i>et al.</i> , 2021; Haurat <i>et al.</i> , 2015; Toyofuku <i>et al.</i> , 2019.
<i>P. aeruginosa</i>	Produce dos tipos de LPS que contienen diferentes antígenos O: el LPS de banda A (carga neutra) y el LPS de banda B (carga negativa). OMV se generan en regiones donde el LPS de banda B es más abundante doblando la membrana externa con la finalidad de reducir la repulsión de carga.	Jan, 2017; Kuehn & Kesty, 2005; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Li <i>et al.</i> , 2020; van der Pol <i>et al.</i> , 2015.
<i>P. aeruginosa</i>	El modelo de “bicapa-pareja” describe un mecanismo en el que la curvatura de la membrana se inicia mediante la inserción de biomoléculas. PQS estimula la formación de OMV al intercalarse en la OM.	Avila-Calderón <i>et al.</i> , 2021; Furuyama & Sircili, 2021; Haurat <i>et al.</i> , 2015; Kulkarni & Jagannadham, 2014; Toyofuku <i>et al.</i> , 2019.
<i>Shewanella oneidensis</i>	La delección del gen degQ, cuyo producto es una proteasa implicada en la degradación de las proteínas periplásmicas, conlleva a la acumulación de estas aumentando la producción de OMV.	Anand & Chaudhuri, 2016; Ojima <i>et al.</i> , 2015.
<i>Serratia marcescens</i>	Estrés térmico produce la inactivación del antígeno común Enterobacteriano (ECA) lo	Haurat <i>et al.</i> , 2015; McMahon <i>et al.</i> , 2012; Sartorio <i>et al.</i> , 2021.

	que mejora la producción de OMV a 22°C o 30°C.	
<i>H. influenzae</i> y <i>V. cholera</i>	El silenciamiento de los genes del sistema transportador de fosfolípidos VacJ/Yrb ABC resulta en la acumulación de fosfolípidos en OM que generan una curvatura aumentando la producción de OMV.	Cai <i>et al.</i> , 2018; Sartorio <i>et al.</i> , 2021; Toyofuku <i>et al.</i> , 2015.
<i>Salmonella</i> entérica, <i>S. typhimurium</i> y <i>B. pertussis</i>	Las modificaciones del lípido A por la enzima lípido-A desacilasa, PagL, produce la acumulación de lípido A desacilado creando una curvatura que conduce a un aumento de la formación de OMV.	Avila-Calderón <i>et al.</i> , 2021; Elhenawy <i>et al.</i> , 2016; McMahon <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2019.
<i>V. cholera</i>	El estrés generado por las condiciones ambientales inducen la expresión de VrrA, un ARN pequeño que reprime la síntesis de OmpA estimulando la producción de OMV.	Haurat <i>et al.</i> , 2015; Sartorio <i>et al.</i> , 2021; Song <i>et al.</i> , 2008.
<i>P. aeruginosa</i>	Las condiciones de estrés que dañan su ADN inducen la expresión de endolisinas que degradan la capa de PG causando lisis celular explosiva en las células bacterias generando fragmentos de membrana que se autoensamblan y forman OMV capaces de transportan endolisinas para lisar otras células.	Furuyama & Sircili, 2021; Li <i>et al.</i> , 1998; Toyofuku <i>et al.</i> , 2019.

### 1.13. Respuesta y modulación inmune inducida por las microvesículas

Las microvesículas, además de contener diversos factores de virulencia en su interior, tienen una inmunogenicidad similar a la de las bacterias que las producen. A través de estudios proteómicos, se ha determinado que las OMV contienen diversas moléculas de superficie como el LPS, lipoproteínas, flagelina, peptidoglicanos y proteínas asociadas a la membrana externa que son reconocidos por las células inmunitarias hospedadoras, además, contienen numerosos patrones



moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que al ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), principalmente por TLR4 y TLR2, aumenta el reconocimiento y la captación de las OMV por parte de las células presentadoras de antígenos (APC) lo que induce su activación y como resultado se activan las vías de señalización de la respuesta inmunitaria innata y adquirida del hospedero (Anand & Chaudhuri, 2016; Ellis & Kuehn, 2010; Jagannadham & Chattopadhyay, 2015; Wang *et al.*, 2019).

Las microvesículas tienen la capacidad de establecer interacciones con diversos tipos de células inmunes, principalmente neutrófilos, macrófagos y células dendríticas residentes del epitelio, que constituyen una de las barreras de protección frente a los microorganismos, que en presencia de las OMV se activan estimulando la producción de citocinas y quimiocinas provocando respuestas proinflamatorias, junto con la activación de las células inmunitarias adaptativas, células B y T, mediada por las moléculas expuestas por las APC, principalmente las células dendríticas, tienen un papel importante en la vinculación entre la inmunidad innata y la adaptativa (Cai *et al.*, 2018).

La captación de las microvesículas por parte de las APC y otras células del hospedero, como las células epiteliales, se puede llevar a cabo por múltiples vías endocíticas como la endocitosis mediada por clatrina, por caveolina, la vía mediada por balsas lipídicas, fagocitosis, macropinocitosis o bien mediante fusión de membrana (Anand & Chaudhuri, 2016; Jahromi & Fuhrmann, 2021; Jan, 2017; Toyofuku *et al.*, 2015).

Diversos estudios realizados en los últimos años han demostrado que las OMV, debido a sus propiedades inmunogénicas, son uno de los componentes clave en el establecimiento de la infección de patógenos bacterianos ya que se han identificado en una gran variedad de tejidos infectados como la nasofaringe de portadores asintomáticos de *N. meningitidis*, líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad meningocócica, tejido gástrico de individuos infectados con *H. pylori*, senos nasales en casos de sinusitis inducidos por *Moraxella catarrhalis* y en

pulmones de pacientes con infecciones no tipificables por *H. influenzae* (Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015).

En un estudio realizado por Vidakovics y colaboradores en el 2010, demostraron que las microvesículas secretadas por *Moraxella catarrhalis* eran capaces de activar las células B de las amígdalas humanas, a través de un mecanismo independiente de las células T mediante el superantígeno MID de unión a inmunoglobulina D expresado en las OMV. Para analizar la producción de citocinas, cultivaron células B amigdalinas purificadas con 10 mg/ml de OMV para posteriormente determinar los perfiles de citocinas, especialmente de la secreción de IL-6, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Además, midieron IgG, IgA e IgM en sobrenadantes de las células B. Los resultados demostraron que la activación de las células B fue mediada por los receptores TLR2 y TLR9 y que la respuesta inmune contra las OMV mediada por estas células resultó en la producción de IL-6 e IgM, además de una mayor densidad de los marcadores de superficie: HLA-DR, CD45, CD64 y CD86. Los autores concluyeron que *Moraxella* puede mediar la respuesta inmunitaria humoral por medio de la utilización de OMV portadoras de superantígenos como señuelo además de conferir resistencia sérica y una respuesta retardada de anticuerpos específicos (Perez-Vidakovics *et al.*, 2010).

Otros estudios han comprobado que las microvesículas son capaces de interactuar con diversos componentes de la inmunidad innata y adaptativa. Las OMV de *H. pylori*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa*, *P. gingivalis*, *Salmonella spp*, *Legionella pneumophila*, *K. pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* son capaces de estimular la producción de IL-8, interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ), IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 e IL-13 así como del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) a través de la activación de macrófagos, activación de neutrófilos o por la maduración de las células dendríticas (DC) que facilitan la presentación de antígenos. Asimismo, se ha determinado que la activación de macrófagos y células dendríticas puede aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras y relacionadas con la presentación de antígenos en su superficie como CD40, CD80, CD83, CD86, complejo principal de histocompatibilidad II (MHC-II), antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR),

ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Cai *et al.*, 2018; Cecil *et al.*, 2017; Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015; Sartorio *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

En conjunto, estos datos demuestran que las microvesículas bacterianas tienen la capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria innata y adaptativa contra la infección mediante la activación de una gran variedad de células del sistema inmune incluidas las células B y células T.

#### 1.14. Aplicaciones de las OMV

Las propiedades inmunogénicas intrínsecas, su comportamiento no replicativo, tamaño, estabilidad a temperaturas variables y resistencia a tratamientos físicos o químicos de las microvesículas, han hecho que sean ampliamente utilizadas para múltiples propósitos biomédicos: como posibles candidatas para el desarrollo de vacunas bacterianas, adyuvantes, agentes de inmunoterapia contra el cáncer así como vehículos para la administración de fármacos, fármacos de quimioterapia, siRNAs y de transporte de antígenos y proteínas (Anand & Chaudhuri, 2016; Balhuizen *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020; Sartorio *et al.*, 2021; Toyofuku *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019).

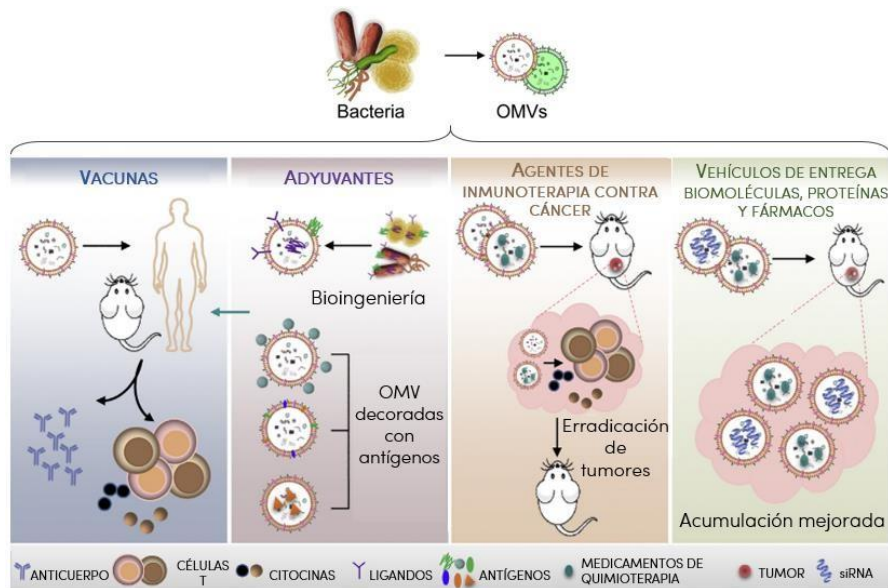


Figura 6. Aplicaciones biomédicas de las microvesículas. Modificada de Li *et al.*, 2020.

Las vacunas requieren dos elementos básicos: un antígeno y un adyuvante. Dado a que las microvesículas contienen diversas moléculas de superficie como proteínas y antígenos asociados a patógenos pueden imitar las propiedades inmunogénicas de las bacterias que las secretan. Además, la presencia de múltiples PAMPs les confiere la capacidad intrínseca de actuar como adyuvantes, lo que las ha catalogado como una atractiva plataforma para el desarrollo de vacunas ya que se ha demostrado que pueden estimular las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas contra diversas infecciones bacterianas. Aunado a lo anterior, al ser entidades no replicativas se propone que pueden brindar mayor seguridad en contraste con el uso de bacterias vivas. Actualmente, se han descrito dos tipos de vacunas basadas en microvesículas: las microvesículas naturales y las modificadas por bioingeniería. Por otra parte, se ha propuesto el uso de vacunas basadas en OMV junto con nanopartículas. Por ejemplo, el recubrimiento de las microvesículas con nanopartículas de oro condujo a una mejora en su estabilidad y uniformidad además de que generó una respuesta inmunitaria más fuerte en comparación con las OMV naturales. En cambio, las OMV contenidas dentro de nanopartículas mostraron una mayor capacidad para inducir respuestas mediadas por anticuerpos y citocinas dependiente de dosis (Balhuizen *et al.*, 2021; Caruana & Walper, 2020; Chatterjee & Chaudhuri, 2011; Ellis & Kuehn, 2010; Furuyama & Sircili, 2021; Kroniger *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2018; Toyofuku *et al.*, 2015).

Hasta la fecha, la vacuna más eficiente y significativa basada en microvesículas que ha sido aprobada por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la FDA es la vacuna MenB Bexsero contra *N. meningitidis* lo que demuestra que las vacunas desarrolladas con OMV pueden ser seguras y eficaces (Cai *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Sartorio *et al.*, 2021; van der Pol *et al.*, 2015).

Análogamente, las microvesículas han sido utilizadas como una nueva plataforma de transporte, entrega y administración dirigida de biomoléculas, proteínas o fármacos a sitios distantes específicos, debido a que pueden transportar y proteger diversos cargos de la degradación y la desnaturalización. Para lograr su utilización como vehículos de administración se han diseñado diversas estrategias que

garantizan la carga y encapsulación exitosa de estas moléculas como electroporación, incubación a temperaturas óptimas, ultrasonificación o tratamientos que modulan su permeabilidad. Además, debido a que las membranas de las OMV están formadas por bicapas lipídicas tienen el potencial de cargar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos a través de difusión pasiva o activa. Las investigaciones apuntan a que las microvesículas también podrían cargarse con compuestos terapéuticos (Jahromi & Fuhrmann, 2021; Kroniger *et al.*, 2018; Li & Liu, 2020; Tan *et al.*, 2018).

Las propiedades intrínsecas antes mencionadas respecto a la estructura de las microvesículas ha permitido su aplicación como agentes de inmunoterapia contra el cáncer ya que se ha informado que presentan actividad antitumoral. De hecho, diversos estudios demostraron que las OMV tienen la capacidad de acumularse en los tejidos tumorales donde posteriormente inducen una respuesta inmune duradera que inhibe el crecimiento tumoral y genera memoria inmunológica al estar mediada por IFN- $\gamma$  y el efecto de permeación y retención mejorada (EPR) lo que resulta en la erradicación de los tumores (Jahromi & Fuhrmann, 2021; Li *et al.*, 2020; Li & Liu, 2020).

Algunos enfoques se han centrado en optimizar el efecto antitumoral de las microvesículas: decorándolas con algunos péptidos dirigidos como arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), anticuerpos o polietilenglicol (PEG); cargándolas con siRNA o a través de la expresión de antígenos o moléculas específicas asociados a tumores. Asimismo, las OMV se han combinado con algunas otras terapias tumorales como nanopartículas que contienen fármacos quimioterapéuticos, radioterapia o terapia de bloqueo de puntos de control inmunitarios con la finalidad de aumentar su circulación sanguínea así como su capacidad de detectar tumores y mejorar su utilización como agentes de inmunoterapia (Chatterjee & Chaudhuri, 2011; György *et al.*, 2015; Jahromi & Fuhrmann, 2021; Sartorio *et al.*, 2021).

En años más recientes, se ha propuesto la modificación de la estructura externa de las microvesículas mediante ingeniería genética: decorando su superficie con proteínas recombinantes; ligandos dirigidos para mejorar la administración de

fármacos de quimioterapia con la finalidad de aumentar su acumulación y capacidad de focalización en tumores y acoplado antígenos heterólogos de interés provenientes de diversas bacterias que pueden estar adheridos a la superficie de las microvesículas o ser producidos directamente por la bacteria utilizando cepas genéticamente modificadas capaces de expresarlos, siendo este último, uno de los enfoques para la generación de vacunas basadas en microvesículas recombinantes (Anand & Chaudhuri, 2016; Furuyama & Sircili, 2021; Sartorio *et al.*, 2021).

Estas modificaciones se han logrado a través de la fusión de diferentes moléculas con proteínas de la membrana externa encontradas en la superficie de las OMV como la proteína ClyA. La fusión directa de algunas enzimas como  $\beta$ -lactamasas, proteínas heterólogas de otras bacterias y fragmentos de anticuerpos al extremo C terminal de ClyA permite mantener y expandir la funcionalidad de estas moléculas (Armstrong *et al.*, 2017; Balhuizen *et al.*, 2021; Caruana & Walper, 2020; Yang *et al.*, 2018).

La modificación genética de las microvesículas busca expandir sus aplicaciones ya que se presume estos cambios en sus perfiles estructurales harán posible el aumento de su especificidad para dirigirse y unirse a las células diana, la entrega específica de cargo, la administración dirigida de fármacos o el transporte de pequeños ARN no codificantes (Anand & Chaudhuri, 2016; Cai *et al.*, 2018; Furuyama & Sircili, 2021; Sartorio *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2018; van der Pol *et al.*, 2015).

Finalmente, una de las principales preocupaciones que limita el uso de las microvesículas es la seguridad, ya que estas contienen componentes endotóxicos como el lípido A capaz de inducir respuestas inflamatorias en el huésped que pueden llegar a ser letales. Por esta razón, se han propuesto diversos mecanismos con la finalidad de generar OMV detoxificadas entre los que se incluyen modificaciones genéticas de la bacteria, modificación de los genes responsables de la síntesis del lípido A y tratamientos con detergentes. En conjunto, estas estrategias han demostrado ser efectivas al reducir la toxicidad convirtiendo a las microvesículas en partículas seguras para el huésped (Anand & Chaudhuri, 2016;

Balhuizen *et al.*, 2021; Cai *et al.*, 2018; Kroniger *et al.*, 2018; van der Pol *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019).

### **1.15. Inmunización por vía intraperitoneal**

La inyección intraperitoneal es una de las vías parentales más comunes para la administración de fármacos, sustancias solubles o suspensiones en pequeños roedores como ratones o ratas. Consiste en la administración del fármaco en la cavidad peritoneal a través de la pared abdominal. El sitio de inyección es en el cuadrante inferior derecho del abdomen del roedor, debido a que los órganos vitales están ausentes en esta área. Esta técnica permite la administración de volúmenes más grandes en comparación con la vía intravenosa e intramuscular. Se ha establecido que el volumen máximo de administración es de 10 mililitros por kilogramo (ml/kg), es decir, de entre 2 y 3 ml en ratones (Shimizu, 2004; Silverman, 2012).

La inmunización intraperitoneal es comúnmente utilizada ya que promueve la rápida absorción de las sustancia por la amplia vascularización de la cavidad peritoneal lo que produce un efecto de distribución rápido. No obstante, en combinación con adyuvantes tipo emulsión, como el adyuvante completo de Freund, permite una lenta liberación de los fármacos (Shimizu, 2004; Talcott *et al.*, 2015).

Con la finalidad de evitar perforar las vísceras, el ciego o los intestino delgado y grueso que se encuentran cerca de la zona de inyección, se deben tener en cuenta dos aspectos importantes: la profundidad de penetración por lo que se sugiere el uso de una aguja relativamente corta, de calibre 23 a 30, es decir de 0.6 a 0.3 milímetros (mm) y el ángulo de inserción de la aguja que debe ser de aproximadamente 10° o 30°, prácticamente en forma paralela a la columna vertebral del roedor. Además, se recomienda que al utilizar esta vía de administración se sujete al animal en una posición de "cabeza hacia abajo" con la finalidad de "desplazar" las vísceras intestinales minimizando así el riesgo de inyección involuntaria en los órganos anteriormente mencionados (Morton *et al.*, 2001; Pekow, 2012; Silverman, 2012).

Por otro lado, es importante destacar existen diversos riesgos y consideraciones que se deben tomar en cuenta al aplicar esta técnica. Algunos de los más frecuentes se enlistan a continuación:

- La inmunización por vía intraperitoneal es una técnica difícil de ejecutar correctamente ya que aumenta el riesgo de producir laceración de órganos abdominales así como lesiones internas. Además, no se puede garantizar que la sustancia se esté depositando en la cavidad peritoneal y no en vasos sanguíneos u órganos como intestino, vejiga o en el ciego.
- Puede producir dolor, fibrosis, adherencias, daño de vasos sanguíneos, sangrado en el lugar de la inyección, perforación de intestino o el ciego, hemorragia interna e incluso peritonitis que resulta en la inflamación e infección de la cavidad peritoneal.
- Esta técnica no es recomendada para especies de mayor tamaño que los roedores ni en hembras preñadas. Aparte de que está catalogada como la vía de administración más estresante para los animales de laboratorio debido a la necesaria inmovilización.
- Por último, las limitaciones más frecuentes son la sensibilidad del tejido a sustancias irritantes, menor tolerancia a soluciones de pH no fisiológico y que las inyecciones de volúmenes demasiado grandes provocan distensión abdominal (Morton *et al.*, 2001; Pekow, 2012; Shimizu, 2004; Silverman, 2012; Talcott *et al.*, 2015).



Figura 7. Inmunización por vía intraperitoneal en ratones.



## 2. ANTECEDENTES GENERALES

En un estudio realizado por Robert C. Alaniz y colaboradores en el año 2007 se demostró que la inmunización de microvesículas de *Salmonella typhimurium* por vía intranasal resultaba en la activación de la respuesta inflamatoria innata debido a una fuerte estimulación de las APC, principalmente de células dendríticas y macrófagos por el reconocimiento de estas, lo que desencadena una producción mejorada de los mediadores proinflamatorios principalmente IL-12 y TNF $\alpha$ , así como el aumento de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de superficie clase II (MHC-II) y una mayor expresión de CD86. Como resultado a lo anterior, los ratones inoculados con OMV indujeron respuestas de células T CD4<sup>+</sup> e inmunoglobulinas específicas de *Salmonella in vivo*, es decir, desarrollaron una respuesta inmune adaptativa específica por la presencia de antígenos protectores presentes en la superficie de las OMV, por lo que presentaron una protección significativa contra el desafío de la infección por *Salmonella* viva (Alaniz *et al.*, 2007).

De acuerdo con los análisis reportados en un artículo llamado “La inmunización con vesículas de membrana externa de *Vibrio cholerae* induce inmunidad protectora en ratones” realizado por Schild y colaboradores la inoculación de OMV obtenidas a partir de un cultivo de *V. cholerae* por vía intranasal, intragástrica e intraperitoneal en ratones, generó protección a través de respuestas inmunitarias específicas contra la colonización bacteriana, misma que se correlacionó con la producción de anticuerpos IgA, inducida principalmente por la vía intranasal e IgM, IgG, IgG1 e IgG2 en aquellos ratones inmunizados por vía intraperitoneal. Posterior a la última inmunización, con un esquema basado en tres inoculaciones con 14 días de diferencia entre cada una, el título de inmunoglobulina total se mantuvo estable durante un período de 3 meses, indicativo de que la inmunización con OMV derivadas de *V. cholerae* induce respuestas inmunes protectoras de larga duración contra este patógeno. Aunado a lo anterior, Schild y colaboradores utilizaron un modelo de ratón neonatal que confirmó la transferencia pasiva de anticuerpos, mismos que generan una respuesta protectora mediada contra las OMV. Estos

hallazgos pueden contribuir al desarrollo de vacunas basadas en OMV contra dicho patógeno (Schild *et al.*, 2008).

Según lo reportado por Bauman y Kuehn, las OMV de *P. aeruginosa* fueron capaces de provocar la producción de IL-8 en cultivos de células de carcinoma de epitelio de pulmón humano, las cuales secretaron quimiocinas proinflamatorias como resultado del reclutamiento y activación de neutrófilos y monocitos. De igual forma, se realizó la determinación de los principales componentes de estas OMV, encontrando principalmente LPS y la flagelina que han demostrado inducir la liberación de moduladores proinflamatorios. Por lo anterior se concluye que las OMV secretadas por *P. aeruginosa* podrían contribuir a la inflamación principalmente en pacientes con fibrosis quística e infecciones de pulmón (Bauman & Kuehn, 2006).

En otro estudio publicado por Durand y colaboradores se demostró que las OMV de *N. meningitidis* estimularon la secreción de IL-8 y la expresión de MHC-II de células dendríticas en ratones que fueron inmunizados por vía intramuscular o subcutánea. Así mismo, el reconocimiento de las OMV indujo la maduración y producción de citocinas por las células dendríticas murinas derivadas de la médula ósea a través de los TLR 2 y 4 así como una respuesta humoral considerable al inducir la proliferación y diferenciación de células B, directa e indirectamente al aumentar la producción de IL-6 e IL-10 (Durand *et al.*, 2009).

Años más tarde en un estudio publicado por Avila-Calderón y colaboradores se inmunizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad mediante dos inoculaciones intramusculares, para posteriormente analizar los sueros de cuatro grupos de referencia: inmunizados con OMV purificados de *B. melitensis* 16 M, con OMV de *B. melitensis* VTRM1, con la cepa de vacuna, *B. melitensis* y un último con solución salina. Seis semanas después de la última inoculación todos los grupos fueron sometidos al reto contra la cepa virulenta *B. melitensis* 16 M por vía intraperitoneal, obteniendo una alta estimulación de macrófagos derivados de la médula ósea que mostraron inducción de interleucina IL-6, IL-10, IL-12 y TNF  $\alpha$ , mismos que presentaban perfiles de títulos variados según la estructura de LPS de la cepa siendo las OMV de la cepa VTRM1 aquellas que estimularon

mayoritariamente la expresión de IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  por parte de las células dendríticas de la médula ósea así como un aumento de los niveles de IgG2a en suero (Avila-Calderón *et al.*, 2012).

Nieves y colaboradores, basados en un estudio previamente realizado por ellos mismos donde demostraron que la inmunización de OMV de *Burkholderia pseudomallei* por vía subcutánea o intranasal en tres dosis, proporcionaba una protección significativa contra el desafío de aerosol de este patógeno en ratones BALB/c, se generaron respuestas de IgG e IgA séricas específicas contra las microvesículas y respuestas de memoria de células T, retomaron su estudio utilizando un modelo de inmunización de primates no humanos, macacos Rhesus (*Macacamulatta*), a los cuales se les inmunizó subcutáneamente un preparado con OMV de *B. pseudomallei* mediante un régimen de aumento de dosis y un esquema basado en tres inmunizaciones, obteniendo como resultado que la inoculación de microvesículas produjo títulos elevados de IgG plasmática específica de OMV, LPS y polisacárido capsular (CPS), generó inmunidad humoral, además de activar respuestas inmunes humorales a proteínas protectoras y antígenos polisacáridos sin ninguna toxicidad o reactividad asociada (Nieves *et al.*, 2011; Petersen *et al.*, 2014).

La vacuna meningocócica del serotipo B (MenB) es la vacuna basada en OMV más representativa y exitosa desarrollada hasta ahora. Contrario a las vacunas desarrolladas para los serogrupos A, C, W y Y de *N. meningitidis* basadas en conjugados de polisacárido acoplados a una proteína transportadora, para el polisacárido capsular MenB la generación de vacunas siguiendo este mismo enfoque no fue posible debido a su baja inmunogenicidad y el riesgo potencial de autoinmunidad por homología con las estructuras moleculares del cerebro humano (Holst *et al.*, 2013; van der Pol *et al.*, 2015). Es por lo anterior, que las proteínas de la membrana externa tal como PorA se consideraron candidatas a vacuna. Aunado a esto, se determinó que PorA es la principal proteína inmunogénica en *N. meningitidis* y que además se encuentra presente en las OMV (Holst *et al.*, 2013).

Con base a estas determinaciones se propusieron varias vacunas basadas en OMV para brindar protección contra la infección meningocócica, tales como: VA-MENGOCOC-BC®, desarrollada en Cuba fue la primera vacuna basada en OMV que proporcionó resultados prometedores con una tasa de protección del 57,2% contra la infección (Bjune *et al.*, 1991). Poco después, en Noruega se desarrollaba MenBvac® que demostró una eficacia de alrededor del 83% en ensayos clínicos, con títulos de anticuerpos elevados y de larga duración (Bjune *et al.*, 1991; GV *et al.*, 1991; Holst *et al.*, 2009; Lapinet *et al.*, 2000; Petousis-Harris, 2018). Finalmente, años más tarde en Nueva Zelanda se desarrolló la vacuna MeNZB® que proporcionó una protección con títulos de anticuerpos elevados y significativos en el 96% de los adultos (Oster *et al.*, 2005). En general se ha caracterizado que las OMV generadas por *N. meningitidis* desencadenan la producción de numerosas citocinas y quimiocinas proinflamatorias a partir de neutrófilos, que incluyen TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$  (MIP-1  $\beta$ ) e IP-10 además de que diversos estudios demostraron que el IFN- $\gamma$  puede mejorar el nivel de estas citocinas para mantener la condición de inflamación crónica (Lapinet *et al.*, 2000).

## 2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS

En un estudio Lee y colaboradores estudiaron la producción de OMV de *K. pneumoniae* para analizar la inducción de la respuesta inmune innata producida en ratones BALB/c y dos líneas celulares: HEp-2 de células epiteliales laríngeas humanas y U937 de monocitos humanos. Se demostró por medio de RT-PCR que el tratamiento de las células HEp-2 con las OMV aumentó significativamente la expresión de genes de las citocinas proinflamatorias IL-1b e IL-8 de manera dependiente a la concentración de OMV, mientras que la expresión de MIP-1 no presento un aumento. Así mismo, no observaron la expresión del gen de IL-6. Al mismo tiempo, el análisis de los pulmones extraídos de ratones BALB/c hembra neutropénicos inoculados con OMV por vía intratraqueal, demostró que estas OMV inducían patología pulmonar *in vivo* además de cambios patológicos más graves en comparación con la infección bacteriana. En conjunto, estos resultados sugieren que las OMV de *K. pneumoniae* inducen una fuerte respuesta inmune innata ya que

pueden ser consideradas como un potente inmunomodulador para inducir una respuesta inflamatoria siendo parte importante en la patogenia de *K. pneumoniae* (Lee *et al.*, 2012).

Martora y colaboradores en el año 2019 utilizaron células BEAS-2B para medir la actividad inflamatoria causada, aplicando diferentes concentraciones de OMVs aisladas de *K. pneumoniae*. Utilizando ensayos de ELISA y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) midieron la secreción de las citocinas IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Primeramente, determinaron a través del ensayo por inmunoabsorción un aumento significativo de la secreción de IL-8 e IL-6, principalmente. Mediante qPCR determinaron que hubo un aumento significativo en la expresión de los genes de citocinas que fueron analizados (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) en las células tratadas con 5  $\mu$ g/ml de OMV. Concluyendo así que, las OMV tienen la capacidad de producir una fuerte respuesta proinflamatoria (Martora *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

En otro estudio más reciente, Zhang y colaboradores estudiaron la secreción de OMV por parte de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (hvKP) con la finalidad de analizar la estimulación de la respuesta inmune innata en ratones C57BL/6, así como en las líneas celulares humanas: A549, BEAS-2B, L02, LX2, HepG2. Demostraron que las OMVs aisladas de hvKP generaron la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8. También, encontraron que las OMV promovían la proliferación de las células A549, inhibían el crecimiento de las células L02 y estimulaban o limitaban la proliferación de las células BEAS-2B con una baja y alta concentración de estas microvesículas, respectivamente. Una observación que recalcan los autores como preocupante es el hecho de que no se haya observado expresión de quimiocinas proinflamatorias en células cancerosas A549 o HepG2. En cuanto al modelo animal, se determinó mediante un ensayo de ELISA que las OMV de hvKP provocaron un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en el líquido de lavado broncoalveolar recogido 24 horas después de la inmunización, por lo que concluyeron que las OMV de hvKP pueden desencadenar una respuesta inflamatoria en el hospedero (Zhang *et al.*, 2021).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las limitadas opciones terapéuticas que existen en la actualidad contra *K. pneumoniae*, así como su creciente resistencia a antibióticos, principalmente en entornos hospitalarios, ha exigido el desarrollo de nuevas estrategias eficaces que permitan contrarrestar y prevenir las infecciones causadas por este patógeno oportunista. Pese a su relevancia, en la actualidad, no hay vacunas disponibles contra *K. pneumoniae*, lo que ha conducido a explorar nuevas tecnologías para el desarrollo de estas. En años más recientes, se han desarrollado diversos estudios en torno a las aplicaciones biomédicas de las OMV de diversas bacterias gramnegativas que han permitido considerarlas como una tecnología factible y prometedora que permitirá el desarrollo de vacunas contra este tipo de enfermedades infecciosas.

No obstante, para *K. pneumoniae* existe información muy limitada acerca del papel de las OMV en la patogénesis de la bacteria y de su potencial inmunogénico. Por ello, en este trabajo, se espera que la inmunización por vía intraperitoneal con microvesículas de las cepas “KpBUAP021” de *K. pneumoniae* en ratones BALB/c induzca una activación por parte de la respuesta inmune que favorezca la producción de anticuerpos policlonales específicos con la finalidad de proponer una vacuna profiláctica basada en estas microvesículas que podría ser clave en el tratamiento de infecciones de origen intrahospitalario, principalmente de personas con comorbilidades, pacientes hospitalizados e inmunodeprimidos.

### 4. HIPÓTESIS

El cargo molecular de las microvesículas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* conllevará a la inducción de una respuesta inmune mediada por la producción de anticuerpos específicos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

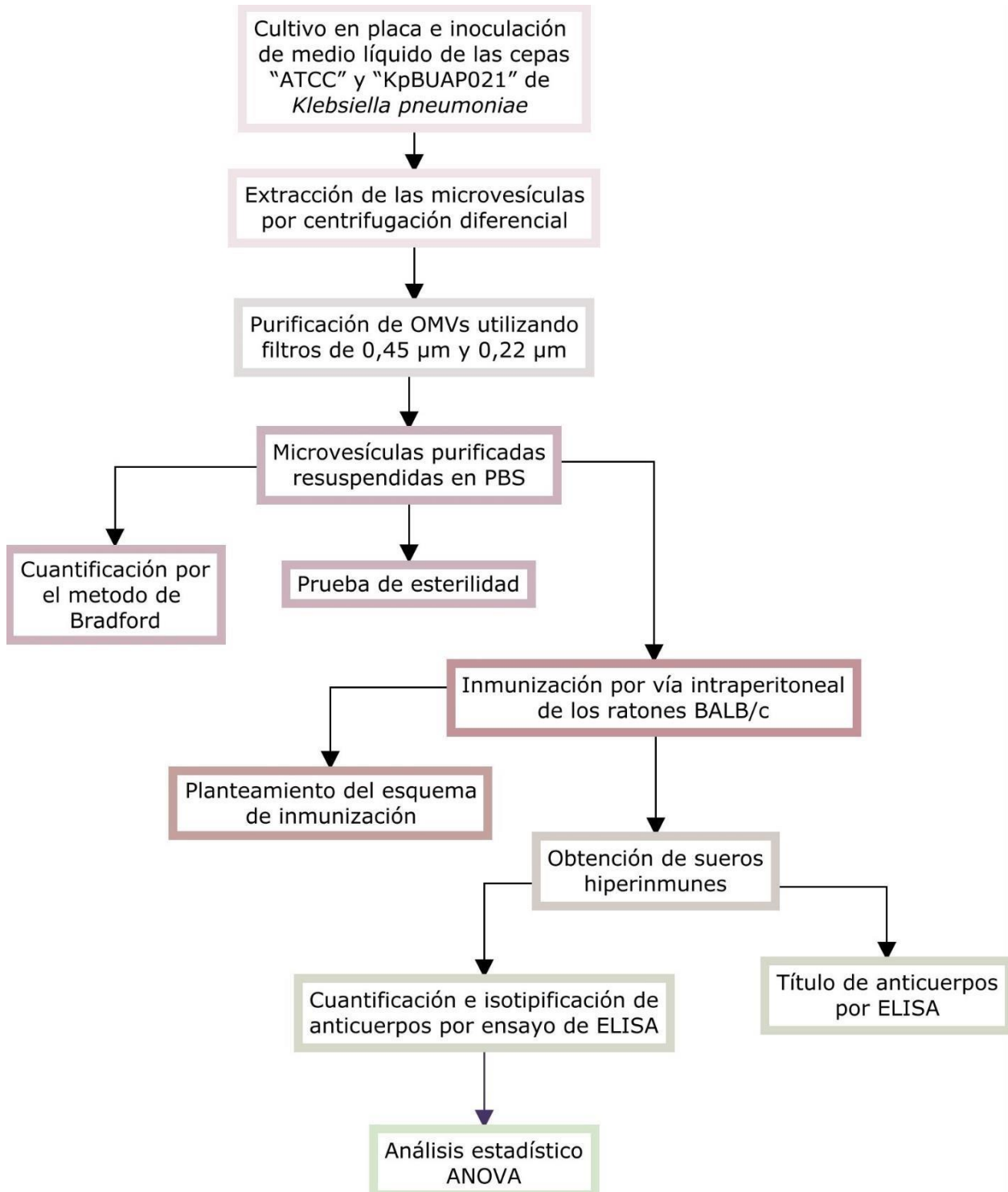
- Caracterizar la respuesta inmune humoral generada por la inmunización por vía intraperitoneal de microvesículas purificadas de *Klebsiella pneumoniae* en un modelo murino.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer las microvesículas a partir de cultivos en medio líquido de las cepas “ATCC” y “KpBUAP021” de *Klebsiella pneumoniae*.
- Purificar las OMVs mediante centrifugación diferencial y filtración.
- Inmunizar un modelo murino por vía intraperitoneal con las microvesículas purificadas.
- Extraer muestras sanguíneas de los ratones inmunizados para obtener los sueros hiperinmunes.
- Analizar la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización con las microvesículas mediante la cuantificación del título e isotipificación de los anticuerpos generados contra las OMVs.

## 6. DISEÑO METODOLÓGICO: MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL





## **6.2. Cultivo en placa e inoculación de *K. pneumoniae***

Las cepas de *K. pneumoniae* ATCC700603 de referencia, y un aislado clínico KpBUAP021, aislado clínico considerado como patógeno oportunista, fueron recuperadas de su almacenamiento en glicerol a -70°C y se resembraron en placa con 25 ml de agar chocolate para posteriormente incubarlas por un periodo de 48 horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo establecido, se tomó una azada de cada una de las cepas y se inoculó con una sola colonia de la placa de agar en 250 ml de medio líquido Luria-Bertani (LB), obteniendo dos matraces cada uno correspondiente a cada una de las diferentes cepas y posteriormente se incubaron durante 72 h a 37°C/180 rpm.

## **6.3. Identificación de las OMV en el medio líquido**

Después de 24 horas de haber realizado la inoculación en el medio líquido, se realizó una tinción de Gram tomando 10 µl de cada uno de los matraces para comprobar que en el medio solo estuviera creciendo *Klebsiella* y así descartar la presencia de algún contaminante. Pasadas las 72 horas se tomaron 5 µl de cada uno de los matraces para realizar nuevamente una tinción de Gram para determinar la presencia de microvesículas en el medio, el análisis para la detección se realizó con un microscopio óptico marca Motic.

## **6.4. Obtención de las microvesículas**

Se extrajeron las OMVs a partir de los cultivos líquidos anteriormente mencionados tomando 50 mililitros de cada uno de los matraces colocándolos en tubos Falcon, estos se etiquetaron con el nombre de cada una de las cepas según correspondía y se centrifugaron a 6,000 rpm durante 20 minutos a 4°C con la finalidad separar las OMV de otros materiales extracelulares y descartar las células bacterianas así como complejos o agregados de proteínas. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se repitió el proceso de centrifugación a 6,000 rpm por 10 minutos. Finalmente, se

pasó el sobrenadante a tubos Eppendorf y se volvió a centrifugar utilizando una microcentrífuga a 12,000 rpm por 10 minutos. Al finalizar el proceso de centrifugación, el sobrenadante se recuperó en un tubo Falcon estéril. Esta metodología se realizó por separado para aislar las microvesículas de las diferentes cepas.

#### **6.5. Purificación de las microvesículas**

Las microvesículas se aislaron pasando los sobrenadantes secuencialmente a través de filtros de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) previamente esterilizados para eliminar las células residuales y los demás componentes celulares no deseados que pudieran interferir o generar un efecto inmunomodulador inesperado. Se tomó el sobrenadante con una jeringa estéril de 10 ml y se pasó a través del filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, el filtrado se tomó con una nueva jeringa y se hizo pasar por el filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para finalmente depositarlo en un tubo Falcon estéril.

#### **6.6. Precipitación de las microvesículas por solvente orgánico**

Se añadieron 20 ml de acetona fría al filtrado y se mezcló por inversión lentamente hasta formar una fase homogénea. A continuación, esta disolución (filtrado + acetona) se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y una vez transcurrido el tiempo, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de las OMV purificadas se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato salino (PBS) y se transfirió a un tubo Eppendorf. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS centrifugando a 12,000 rpm por 10 minutos y decantando el sobrenadante para eliminar el solvente utilizado. Se obtuvo como producto final 2 tubos Eppendorf, uno para cada cepa.

#### **6.7. Prueba de esterilidad**

Se comprobó la esterilidad de las OMV purificadas antes de su uso tomando 10  $\mu\text{l}$  depositándolos en placas de agar chocolate, incubando a 37°C por 24 y 48 horas.

Posteriormente, tras comprobar la esterilidad de las OMVs se almacenaron a -20°C hasta su uso.

#### **6.8. Cuantificación por reactivo de Bradford**

La concentración de las OMV purificadas se determinó usando el ensayo de Bradford. La curva estándar de albumina se realizó utilizando las siguientes concentraciones: 0.5 µg/µl, 1 µg/µl, 5 µg/µl, 10 µg/µl, 20 µg/µl y 30 µg/µl. Se utilizó una placa de MICROELISA donde se colocaron las concentraciones antes mencionadas de albúmina de suero bovino (BSA) y 5 µl de las microvesículas encada uno de los pozos de una de las filas y a continuación se agregaron 200µl del reactivo Bradford. Se agitó e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

#### **6.9. Inmunización por vía intraperitoneal de ratones BALB/c**

Se adquirieron 5 ratones: 1 macho y 4 hembras BALB/c de 6 semanas de edad del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Protocolo de investigación aprobado: 100522577-UALVIEP-18/1.

El macho fue sangrado por medio de un corte en la parte terminal de la cola para obtener una muestra sanguínea que fue centrifugada a 5,000 rpm por 10 minutos con la finalidad de obtener el suero preinmune. Almacenando este último a -20°C para posteriores usos.

Los ratones se dividieron en dos grupos problema, con una n=2 cada uno, dejando a aquel del cual se obtuvo el suero preinmune como control negativo. Se inmunizaron por vía intraperitoneal con 100 µl de las microvesículas purificadas en proporción 1:1 con el adyuvante completo de Freund. Los ratones del primer grupo se inmunizaron con las OMV de la cepa “ATCC”, mientras que los del otro grupo recibieron las OMV de la cepa KpBUAP021.

Se planteó un esquema de inmunización que comprendió cuatro refuerzos cada siete días con inmunizaciones de las microvesículas por la misma vía de inmunización, pero cambiando a adyuvante incompleto de Freund. Durante la

inmunización los animales recibieron agua y alimento *ad libitum*, además su manejo se llevó de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

#### **6.10. Obtención de sueros de los ratones inmunizados**

Al término del esquema de inmunización los ratones se sangraron por medio de un corte en la parte terminal de la cola de donde se obtuvo una muestra sanguínea de aproximadamente 500 µl de cada uno que fue centrifugada a 5,000 rpm por 5 minutos para obtener el suero inmune con la finalidad de obtener los anticuerpos policlonales generados por la inmunización de las microvesículas, mismo que fue recuperado y almacenado a -20°C.

#### **6.11. Título de anticuerpos**

Se recubrió una placa de MICROELISA de 96 pozos con 10 µg/µl de las microvesículas extraídas de ambas cepas: "ATCC" y KpBUAP021 (contemplando la serie de pozos blanco) para después incubarla a 4°C por 24 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 (PBST) al 0,05% y se añadieron 100 µl de BSA a cada uno de los pozos para después incubar la placa a 37°C por una hora. Se realizaron las siguientes diluciones a partir de los sueros de los ratones inmunizados: 1:100, 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000 y 1:20,000 en PBS y una vez transcurrido el tiempo, se adicionó a cada pozo 100 µl de cada una de las diluciones anteriormente mencionadas, exceptuando el pozo blanco donde se adicionaron 100 µl PBS, y se incubó por dos horas a temperatura ambiente. Se decantó y se realizaron tres lavados con PBST. A continuación, se adicionaron 50 µl del anticuerpo IgG anti-mouse marcados con peroxidasa de rábano (HRP-goat anti-mouse IgG) hechos en cabra en dilución de 1:5000 a cada pozo. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se decantó el contenido y nuevamente se realizaron tres lavados. Por último, se adicionó 100 µl de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (Zymed, ZymedLabs, San Francisco, CA, EE. UU.) como sustrato y se incubó la placa a temperatura ambiente por 15 minutos para después

realizar la lectura de la misma a una absorbancia 630nm en un lector de microplacas ELISA (lector MultisKan MS, Labsystems, Finlandia).

### **6.12. Isotipificación de Anticuerpos**

La determinación de los isotipos de las inmunoglobulinas se realizó mediante un inmunoensayo de ELISA utilizando el KIT ISO2 de SIGMA una vez que los títulos de anticuerpos fueron de 1:10,000. Se midieron los niveles de IgG incluyendo IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recubrieron las placas con 10 µg/µl de microvesículas "ATCC" y KpBUAP021 y se incubaron a 4°C por 24 horas. Las placas se lavaron en tres ocasiones con una disolución PBST al 0,05% y se incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 µl de BSA al 1%. Posteriormente, se lavaron PBST, y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con 100 µl de los sueros de los ratones inmunizados en una disolución de 1:500 en PBS. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se decantó la placa y se realizó otro ciclo de tres lavados. A continuación, se añadieron 50 µl de PBS a los pozos blanco y 50 µl por pozo de la dilución 1:1000 de las subclases de los anticuerpos Igs, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se decantó y se realizaron cuatro lavados. Seguidamente, se añadieron 50 µl del anticuerpo HRP-goat anti-mouse IgG en dilución de 1:5000 a cada pozo, se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, se decantó y se realizaron cuatro lavados. Finalmente, se adicionaron 100 µl de sustrato TMB (Zymed, ZymedLabs, San Francisco, CA, EE. UU.) como sustrato y transcurridos 15 minutos se leyó la reacción que se presenta con un viraje de coloración a 630 nm en un lector de microplacas ELISA (lector MultisKan MS, Labsystems, Finlandia).

### **6.13. Análisis estadístico**

Con los datos obtenidos a partir de los inmunoensayos ELISA utilizados en la determinación de los isotipos de inmunoglobulinas se realizó un análisis estadístico ANOVA utilizando el programa GraphPAD8.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Identificación de las microvesículas en medio líquido LB

La secreción de las microvesículas por parte de las cepas “ATCC” y KpBUAP021 de *K. pneumoniae* durante su crecimiento en medio líquido LB, se confirmó a través de un análisis microscópico del cultivo resultante después de la inoculación de la bacteria. Después del periodo de incubación, se confirmó la probable presencia de las microvesículas por la morfología observada en el microscopio óptico (100 X) donde se observa la célula de *Klebsiella* rodeada de microvesículas (figura 8).

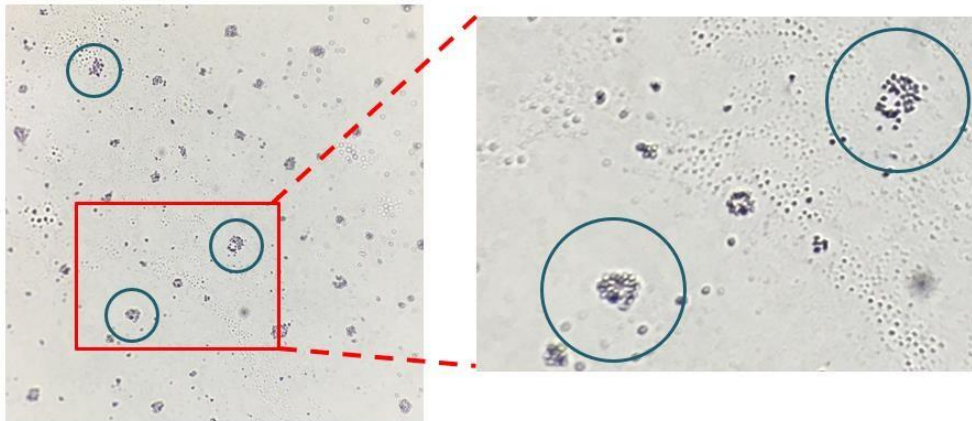


Figura 8. Crecimiento de *K. pneumoniae* en LB líquido a las 72 horas donde se muestra la secreción de microvesículas al medio de cultivo. En el recuadro se observa una ampliación de la imagen para una mejor visualización.

### 7.2. Purificación de las microvesículas

Después de confirmar la presencia de las microvesículas de ambas cepas en el medio líquido, se procedió con el proceso de extracción por medio de centrifugación diferencial y purificación utilizando filtros de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, se realizó un análisis utilizando el microscopio óptico (100 X) con la finalidad de descartar la presencia de células bacterianas o algún contaminante microbiológico.

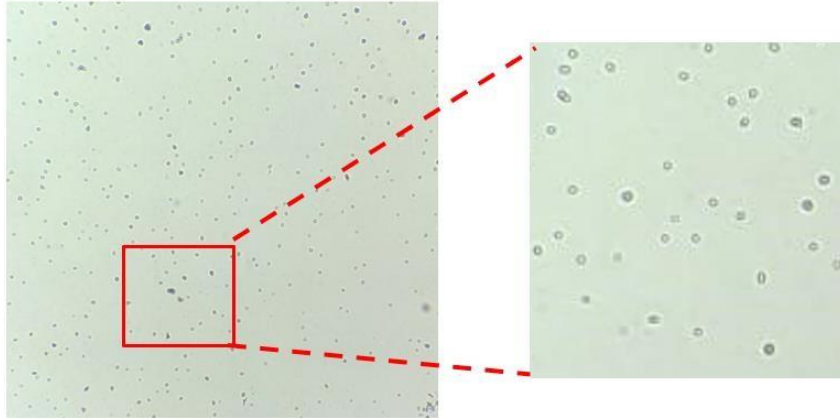


Figura 9. Microvesículas de la cepa “KpBUAP021” de *K. pneumoniae* purificadas mediante centrifugación diferencial y filtración en membrana de nylon resuspendidas en PBS a las 96 horas de crecimiento bacteriano. En el recuadro se observa una ampliación de las OMV purificadas.

Una vez recuperadas las microvesículas de ambas cepas “ATCC” y KpBUAP021 y previo a la inmunización se analizó la ausencia de bacterias cultivables mediante una prueba de esterilidad. Finalmente, 72 horas después de que no hubo crecimiento sobre la placa se concluyó que las microvesículas estaban estériles. La obtención final de las microvesículas estériles permitió realizar la cuantificación indirecta mediante la determinación de proteínas mediante el reactivo de Bradford.

### 7.3. Cuantificación de las microvesículas por el método de Bradford

La concentración de las dosis de inmunización se basó en los resultados obtenidos del viraje de color utilizando el reactivo de Bradford y de acuerdo con la intensidad de color de cada pozo, basado como resultado a las distintas concentraciones de proteínas, se determinó que la concentración de proteínas presentes en las microvesículas que sería utilizada para las inmunizaciones era de 10 µg por cada 100 µl.

**Tabla V. Protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Pozo de la placa de ELISA	Concentración de BSA ( $\mu\text{g}$ )	Volumen de BSA 1 mg/ml ( $\mu\text{l}$ )	Reactivo de Bradford
Blanco	0	0 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
1	0.5	0.5 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
2	1	1 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
3	5	5 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
4	10	10 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
5	20	20 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
6	30	30 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
Resultados obtenidos de las muestras			
Pozo de la placa de ELISA	Concentración de proteínas presente en las microvesículas ( $\mu\text{g}$ )	Volumen de microvesículas ( $\mu\text{l}$ )	Reactivo de Bradford
OMV "ATCC"	0.5 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
OMV KpBUAP021	0.5 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$

#### **7.4. Protocolo de inmunización**

Previamente a las inmunizaciones de los cuatro ratones hembra, se obtuvo suero preinmune del único ratón macho mediante sangrado por corte de cola que consiste en la inmovilización del ratón utilizando un dispositivo que en este caso fue un tubo Falcon adaptado para la realización de este procedimiento. Una vez que el animal estuvo dentro del tubo, se limpió la parte terminal de la cola aplicando etanol al 70% con la finalidad de eliminar cualquier resto de heces u orina. Posteriormente, se realizó un corte perpendicular en el extremo de la cola utilizando una tijera de cirugía tratando de no cortar más de 2 mm. Finalmente, la muestra de sangre se recolectó en un tubo Eppendorf y se realizó hemostasia por aproximadamente 40 segundos hasta detener la hemorragia.

Se estableció el esquema de inmunización que comprendió cuatro refuerzos cada siete días de las microvesículas donde la primera inmunización fue con adyuvante



completo de Freund, mientras que las tres inmunizaciones restantes se aplicaron con adyuvante incompleto de Freund como se muestra en la tabla VI.

Se inmunizaron los ratones hembra de seis semanas de edad los días 0, 7, 14 y 28 con 10 microgramos de microvesículas contenidos en 100 µl de las microvesículas purificadas emulsificadas 1:1 con el adyuvante según correspondía por vía intraperitoneal: a un grupo de ratones se les inmunizó con las OMV de la cepa “ATCC”, mientras que el otro grupo recibió las OMV de la cepa KpBUAP021.

**Tabla VI. Esquema de inmunización por vía intraperitoneal**

	Esquema de inmunización			
	1° inmunización Semana 1	2° inmunización Semana 2	3° inmunización Semana 3	4° inmunización Semana 4
Grupo de ratones “ATCC” (2 ratones)	Microvesículas “ATCC” con adyuvante completo de Freund (1:1)	Microvesículas “ATCC” con adyuvante incompleto de Freund (1:1)	Microvesículas “ATCC” con adyuvante incompleto de Freund (1:1)	Microvesículas “ATCC” con adyuvante incompleto de Freund (1:1)
Grupo de ratones “KpBUAP021” (2 ratones)	Microvesículas KpBUAP021 con adyuvante completo de Freund (1:1)	Microvesículas KpBUAP021 con adyuvante incompleto de Freund (1:1)	Microvesículas KpBUAP021 con adyuvante incompleto de Freund (1:1)	Microvesículas KpBUAP021 con adyuvante incompleto de Freund (1:1)

### 7.5. Obtención de sueros hiperinmunes

Al término del esquema de inmunización todos los ratones inmunizados se sangraron por medio corte en la parte terminal de la cola utilizando el protocolo que se describió anteriormente, de donde se obtuvo una muestra sanguínea de aproximadamente 500 µl y 200 µl de suero por cada ratón después de realizar la centrifugación de cada una de las muestras con la finalidad de obtener el suero hiperinmune. Es importante mencionar que durante y después de las inmunizaciones los animales no presentaron caída de pelo, inflamación en la zona abdominal ni afectaciones en su peso.

## 7.6. Cuantificación del título de anticuerpos

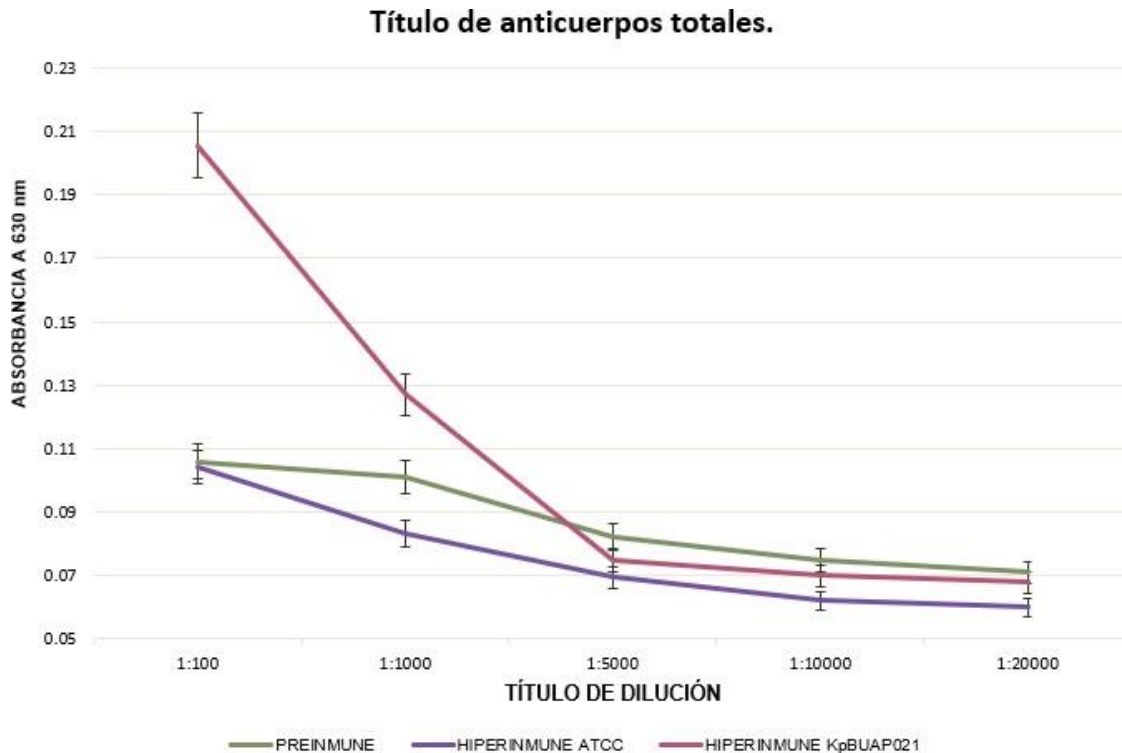
Con la finalidad de comprobar si se tenía un buen título de anticuerpos y determinar si es que existía una diferencia en los mismos después de la inmunización con las microvesículas, se cuantificó mediante un ensayo de ELISA la presencia de inmunoglobulinas IgGs totales presentes en los sueros hiperinmunes y el suero preinmune. Para la realización de este ensayo se analizaron diferentes disoluciones de los sueros: 1:100, 1:1,000, 1:5,000, 1:10,000 y 1:20,000.

Adicionalmente, se realizó el cálculo de la desviación estándar a partir de los títulos totales obtenidos del suero preinmune y los dos sueros hiperinmunes: “ATCC” y KpBUAP021. Estos resultados se muestran en la tabla VII.

**Tabla VII. Valores de absorbancia de los títulos de anticuerpos de cada suero con su respectiva desviación estándar.**

Dilución del suero	Preinmune	Hiperinmune “ATCC”	Hiperinmune “KpBUAP021”	Desviación estándar
1:100	0.106	0.104	0.2055	0.0580
1:1000	0.101	0.083	0.127	0.0221
1:5000	0.082	0.0695	0.075	0.0062
1:10000	0.075	0.062	0.07	0.0065
1:20000	0.0710	0.06	0.0680	0.0056

Los datos obtenidos después de realizar la lectura de absorbancia a  $\lambda=630\text{nm}$  en un lector de microplacas ELISA se graficaron con ayuda de Excel donde se observan las diferencias entre los sueros preinmune e hiperinmunes conforme las diluciones evaluadas (1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10.000, 1:20,000).



Gráfica I. Títulos de anticuerpos totales de los sueros preinmune e hiperinmune “ATCC” y KpBUAP021. Los datos fueron obtenidos mediante un ensayo de ELISA. La absorbancia fue leída a 630 nm. La desviación estándar de cada dilución es: 1:100 (0.0580), 1:1000 (0.0221), 1:5000 (0.0062), 1:10,000 (0.0065) y 1:20,000 (0.0056).

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que existe una diferencia significativa entre los títulos del suero preinmune contra los dos sueros hiperinmunes (“ATCC” y KpBUAP021). Además, los valores de absorbancia de los sueros hiperinmunes indican la presencia de anticuerpos policlonales IgGs específicos contra las microvesículas debido a que son mayores en comparación con los del suero preinmune en todas las diluciones, principalmente en KpBUAP021.

### 7.7. Isotipificación de las inmunoglobulinas

Para corroborar que las OMV aisladas de *K. pneumoniae* actúan como inmunógenos y caracterizar la respuesta inmune inducida en los ratones inmunizados por vía intraperitoneal, se determinó la distribución de isotipos de inmunoglobulinas (Igs) específicas contra las microvesículas en los sueros

hiperinmunes de ambos grupos y el control 1 semana después de la inmunización final mediante un ensayo de ELISA.

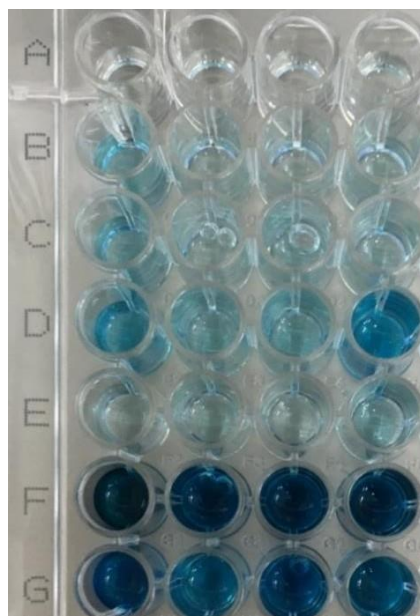


Figura 10. Placa de ELISA donde se realizó la isotipificación usando el KIT ISO2 de SIGMA. En la fila “A” se localiza el blanco; en las filas “B” y “C” el suero preinmune “control”; en “D” y “E” el suero hiperinmune “ATCC” y en “F” y “G” el suero hiperinmune KpBUAP021. La imagen es representativa de tres ensayos independientes.

Los datos obtenidos después de la lectura de absorbancia a 630 nm fueron evaluados mediante análisis estadístico ANOVA de una vía utilizando el programa GraphPad Prism 8 que mostró como resultado un valor de P de <0.001 lo que permite rechazar la hipótesis nula que supone que todas las medias son iguales.

**Tabla VIII. Resumen de los datos obtenidos en el análisis estadístico ANOVA.**

Resumen de análisis estadístico ANOVA	
P value	<0.001
¿Diferencia significativa entre medias (P < 0.05)?	Yes
R square	0.9789

**El análisis fue realizado en GraphPad Prism 8.**

Por otra parte, el análisis de varianza ANOVA permitió el cálculo del ajuste de la suma de los cuadrados (SC), grados de libertad (DF por sus siglas en inglés), ajuste de la media cuadrática (MS) y el valor de F.

**Tabla IX. Resultados del análisis de varianza ANOVA de una vía.**

ANOVA	SC	Grados de libertad (DF)	MS	Valor de F	Valor de P
Anticuerpos	51.32	2	25.66	208.3	P<0.001
Error	1.109	9	0.1232		
Total	52.43	11			

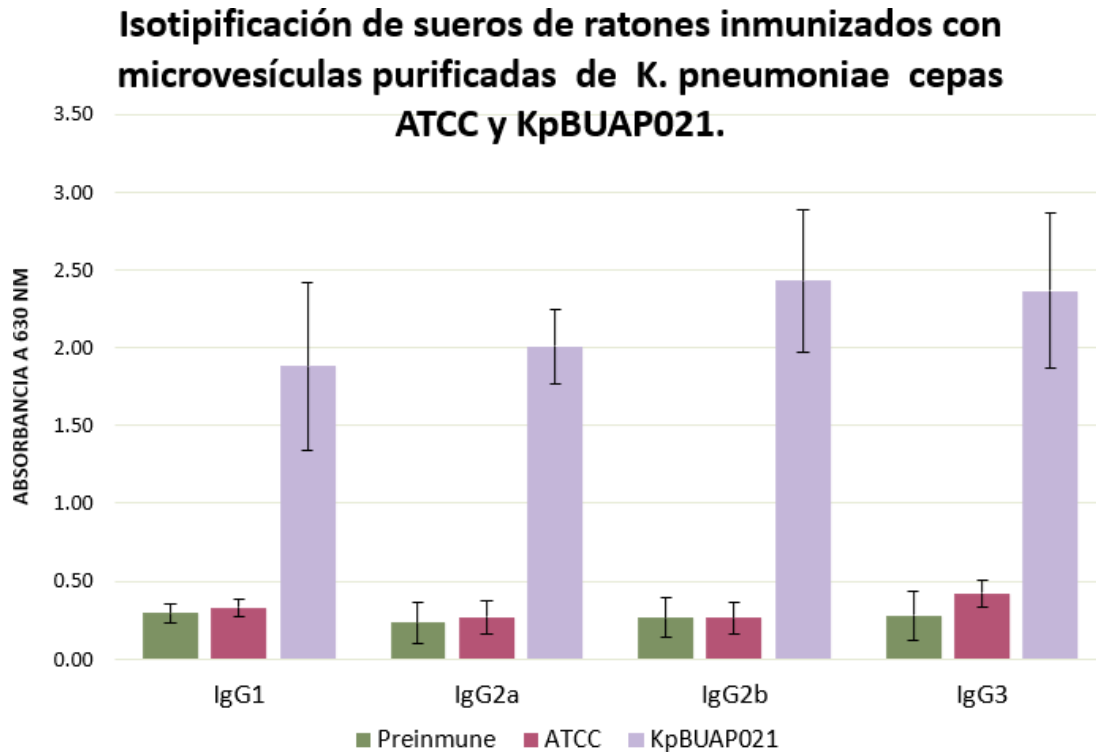
Finalmente, el análisis estadístico permitió el cálculo de la desviación estándar de cada una de las inmunoglobulinas (Tabla X).

**Tabla X. Desviación estándar de cada uno de los isotipos encontrados en los suero preinmune e hiperinmunes “ATCC” y “KpBUAP021”.**

Desviación estándar				
$\sigma$	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Preinmune	0.0608	0.131	0.123	0.154
ATCC	0.057	0.104	0.105	0.088
KpBUAP021	0.54	0.24	0.46	0.50

Los resultados obtenidos muestran una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de inmunoglobulinas por parte de los animales inmunizados con las microvesículas de KpBUAP021 con respecto al suero preinmune del ratón no inmunizado y animales inmunizados con las microvesículas de “ATCC” ( $p<0.001$ ). En la gráfica II se muestran los valores de absorbancia de los sueros preinmune, hiperinmune “ATCC” e hiperinmune KpBUAP021 y de acuerdo con las medias obtenidas los isotipos encontrados son  $IgG2b> IgG3>IgG2a>IgG1$ .

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la inmunización de microvesículas de la cepa KpBUAP021 induce una mayor respuestas de anticuerpos específicos en comparación con las microvesículas de la cepa “ATCC”.



Gráfica II. Isotipificación de sueros de ratones inmunizados con microvesículas purificadas de *K. pneumoniae* cepas “ATCC” y KpBUAP021” y suero preimmune usando KIT ISO2 de SIGMA. La placa de ELISA fue leída a 630 nm. Se muestra una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de inmunoglobulinas por parte de los animales inmunizados con las OMV de KpBUAP021 con respecto al suero preimmune y animales inmunizados con las OMV de “ATCC” ( $p < 0.001$ ). La gráfica representa el promedio de tres ensayos independientes.

## 8. DISCUSION DE RESULTADOS

Las infecciones nosocomiales son catalogadas como una de las amenazas de salud pública más importante en los últimos años, ya que se estima que entre el 5% y 10% de los pacientes que ingresan a un hospital contraerán al menos una IAAS (WHO, 2005; WHO, 2021). No obstante, hoy en día muchos países, principalmente países en desarrollo, carecen de un sistema de vigilancia que permita el monitoreo y control de estas.

*Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista considerado como una de las principales bacterias Gramnegativas que causa infecciones nosocomiales a nivel mundial, sobre todo, en pacientes inmunocomprometidos, con comorbilidades, sometidos a procesos quirúrgicos y pacientes en unidades de cuidados intensivos o que requieren del uso de dispositivos médicos permanentes como catéteres o ventiladores mecánicos, e inclusive en recién nacidos (Podschun & Ullmann, 1998; Voidazan *et al.*, 2020).

Adicionalmente, la creciente resistencia a los antibióticos que presenta *K. pneumoniae*, así como su capacidad de adquirir multiresistencia e incluso pan resistencia limita el tratamiento de estas infecciones. La OMS advirtió acerca de la inminente necesidad de desarrollar nuevos antibióticos, pues desde hace más de 40 años no se han desarrollado nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gramnegativas (Choi *et al.*, 2019; WHO, 2016), lo que exige la generación de nuevas terapias así como el desarrollo de vacunas que funcionen como tratamientos profilácticos permitiendo prevenir, controlar y reducir la incidencia de este tipo de infecciones.

Actualmente, existen diversos enfoques terapéuticos que han sido desarrollados con la finalidad de prevenir las infecciones causadas por *K. pneumoniae*. Estos incluyen la inmunización activa basada en la inoculación de un múltiple epítopo microbianos, lo que ha permitido el desarrollo de vacunas (Podschun & Ullmann, 1998). Hasta la fecha, las vacunas que se han generado contra este patógeno incluyen: vacunas de células bacterianas atenuadas o inactivadas; extractos

celulares propuestos como una alternativa para la generación de una vacuna libre de células; vacunas de subunidades basadas en proteínas inmunogénicas como toxinas, proteínas de superficie como OMP, proteínas fimbriales, CPS y de LPS y vacunas ribosomales (Ahmad *et al.*, 2012; Assoni *et al.*, 2021; Choi *et al.*, 2019).

Recientemente, algunos otros enfoques terapéuticos incluyen screening genómico, el uso de bacteriófagos específicos de *K. pneumoniae* e inmunoterapia pasiva lo que ha conllevado al desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAb) (Ahmad *et al.*, 2012; Assoni *et al.*, 2021; Choi *et al.*, 2019).

A pesar de todas estas alternativas terapéuticas, hasta la fecha, no existe ninguna vacuna contra *K. pneumoniae* autorizada por la FDA. Mas aún, no se han publicado informes sobre estudios clínicos de vacunas contra esta bacteria desde mediados de la década de 1990 (Choi *et al.*, 2019). Lo anterior, se debe en gran medida a que todos estos enfoques han presentado diversas problemáticas que van desde una baja inmunogenicidad de sus componentes hasta elevados costos de producción. Además, la reducción de la infección bacteriana no fue estadísticamente significativa y la mayoría de las vacunas propuestas presentaron seguridad limitada y reacciones toxicas adversas (Choi *et al.*, 2019; Sartorio *et al.*, 2021; Toyofuku *et al.*, 2015).

En años más recientes, las microvesículas se han considerado como un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra infecciones bacterianas, ya que diversos estudios han comprobado su capacidad para inducir respuestas inmunitarias adaptativas específicas. Diversos estudios realizados en modelos animales han demostrado que la inmunización de OMV puede conferir una protección completa contra diversas infecciones causadas por una amplia variedad de bacterias (Chatterjee & Chaudhuri, 2011; Huang *et al.*, 2014; Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015; Timothy Prior *et al.*, 2021).

Las OMV derivadas de bacterias Gramnegativas patógenas presentan diversas características necesarias para la generación de una vacuna eficaz: en primera instancia contienen múltiples antígenos de superficie capaces de inducir tanto una respuesta humoral como una respuesta inmune mediada por células T. Además, su



tamaño pequeño facilita su procesamiento por parte de las células presentadoras de antígenos (Furuyama & Sircili, 2021).

No obstante, a pesar de que diversos estudios se han enfocado en describir la producción y funcionalidad de las OMV de diversos microorganismos gramnegativos como plataformas vacunales, hasta la fecha no existe mucha información acerca del potencial inmunogénico que presentan las microvesículas secretadas por *K. pneumoniae*. Es por ello, que en este trabajo se analizó la respuesta inmune humoral provocada después de la inmunización por vía intraperitoneal de las microvesículas secretadas por este patógeno Gramnegativo.

En este trabajo se logró aislar microvesículas a partir de dos cepas de *K. pneumoniae*: "ATCC" y KpBUAP021 mediante centrifugación diferencial. Debido a la baja densidad de las OMV en comparación con los componentes presentes en la célula bacteriana como proteínas, flagelos, pili, etc., durante la centrifugación basada en el gradiente de densidad, las microvesículas migran a fracciones más ligeras, razón por la cual al realizar el aislamiento se debe recuperar el sobrenadante (Klimentová & Stulík, 2015). Como paso adicional para garantizar la purificación de las microvesículas los sobrenadantes previamente centrifugados se clarificaron a través de filtros de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  como se describe en bibliografía consultada (Bauman & Kuehn, 2006; Ellis *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2011; Timothy Prior *et al.*, 2021; Toyofuku *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2013).

Una vez obtenidas las microvesículas, se verificó estuvieran libres de contaminantes bacterianos, se determinó la concentración obtenida y posteriormente se utilizaron para la inmunización intraperitoneal de los ratones BALB/c. Después de concluir el esquema de inmunización planteado, se analizó la inmunogenicidad de las microvesículas y la distribución de isotipos de IgG en sueros hiperinmunes de los ratones inmunizados con las microvesículas de la cepa de referencia "ATCC" y el aislado clínico KpBUAP021 de *K. pneumoniae*. Los anticuerpos presentes en los sueros preinmune e hiperinmunes se cuantificaron mediante un ensayo de ELISA donde se utilizaron las diluciones 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10,000 y 1:20,000 de

estos. Los títulos de IgG fueron analizados 5 semanas después de la primera inmunización. Los datos obtenidos al realizar la lectura de la placa a una absorbancia de 630 nm denotan que el título de anticuerpos es conmensurable desde la dilución 1:20,000.

Los resultados de estos títulos revelan una diferencia notoria entre el suero hiperinmune de los ratones inmunizados con las microvesículas de la cepa KpBUAP021 que mostraron ser mucho mayores a los títulos medidos para los ratones inmunizados con las microvesículas de la cepa "ATCC". Cabe señalar que los títulos de IgG desarrollados en ratones inmunizados con la cepa "ATCC" estaban casi a la par con el suero preinmune utilizado como control como se muestra en la gráfica 1, lo que evidencia una débil inmunogenicidad por parte de las microvesículas de esta cepa.

Este ensayo demuestra que la inmunización por vía intraperitoneal de las microvesículas secretadas a partir de la cepa KpBUAP021 presentan una mayor inmunogenicidad, capaz de inducir un aumento en el título de anticuerpos, contrario a lo observado con las microvesículas de la cepa "ATCC".

Además de la cuantificación de las IgG, los isotipos de anticuerpos específicos generados contra las microvesículas se caracterizaron mediante un ensayo de ELISA. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico de varianza (ANOVA de una vía), mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en la expresión de inmunoglobulinas G por parte de los ratones inmunizados con las microvesículas de la cepa KpBUAP021 que desarrollaron respuestas de anticuerpos del tipo IgG más sólidas contra las OMV durante las semanas posteriores a la inmunización, en comparación con el suero preinmune y los ratones del grupo "ATCC", por lo que se rechazó la hipótesis nula donde se plantea que las medias para todos los isotipos son iguales. Asimismo, de acuerdo con los datos obtenidos a partir del análisis estadístico el isotipo de anticuerpos fue: IgG2b>IgG3>IgG2a>IgG1.

Los niveles de isotipos IgG (IgG1, IgG2a, IgG2a e IgG3) presentes en el suero inducidos por la inmunización de las microvesículas de la cepa KpBUAP021

muestran que la protección conferida por parte de la respuesta inmune esta equilibrada entre Th1/Th2 sugiriendo una activación de la inmunidad adaptativa mixta humoral y celular, ligeramente sesgada hacia Th1 (IgG2b>IgG1). De hecho, los niveles de IgG2b desarrollados en los ratones BALB/c inmunizados con las microvesículas KpBUAP021 pueden considerarse como ligeramente elevados tomando en cuenta que la cepa BALB/c tiende a desarrollar una respuesta inmunitaria predominantemente Th2 (Nakamura, 2013).

Se ha reportado que los linfocitos Th1 y Th2 son linfocitos T efectores diferenciados a partir de linfocitos T vírgenes CD4+. El subgrupo Th1 estimula la inmunidad de tipo inflamatoria que resulta principalmente en la producción de citocinas proinflamatorias y es inducido por la interleucina 12 (IL-12) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Es la principal población de linfocitos T efectores en la defensa mediada por fagocitos, ya que una de sus funciones principales es la activación de las células dendríticas, macrófagos y los linfocitos NK, lo cual se considera importante para la destrucción de patógenos intracelulares. Además, mediante la liberación de IFN- $\gamma$  e IL-12, activa a los linfocitos T citotóxicos (CD8+), promueve la actividad de las NKy estimula la producción de algunos anticuerpos IgG opsonizantes, al mismo tiempo que activa el complemento, promoviendo la fagocitosis de los microorganismos opsonizados. El IFN- $\gamma$  actúa sobre linfocitos B para promover el cambio a ciertas subclases de IgG sobre todo IgG2a mientras inhibe el cambio a isotipos dependientes de la interleucina 4 (IL-4) impidiendo la proliferación de Th2 (Abbas, 2015; Collins, 2016; Delves, 2016; Fazilleau *et al.*, 2009; Romagnani, 2000).

Por el contrario, la respuesta inmunitaria Th2, promovida por la IL-4, es considerada importante contra patógenos extracelulares. Este subgrupo estimula las reacciones mediadas por mastocitos y eosinófilos, además, se caracteriza por la producción de elevados títulos de anticuerpos, producto de la secreción de citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 y la estimulación de la inmunidad de tipo antiinflamatorio encargada de restablecer la homeostasis después del desafío contra patógenos de tipo extracelular. Análogamente, la IL-4 induce la producción de IgG1 e IgE mientras que

inhibe al isotipo IgG2a (Abbas, 2015; Collins, 2016; Delves, 2016; Fazilleau *et al.*, 2009; Romagnani, 2000).

De forma general, las funciones de los anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 son diferentes. No obstante, trabajan en armonía con la finalidad de establecer una respuesta inmune exitosa. Los isotipos IgG2a, IgG2b e IgG3 murinos contribuyen principalmente a la inmunidad de tipo proinflamatoria, al mismo tiempo que pueden unirse y activar eficazmente el sistema del complemento (Baudino *et al.*, 2008; Collins, 2016; Damelang *et al.*, 2019; Fazilleau *et al.*, 2009; Kao *et al.*, 2017; Sin *et al.*, 1999).

El isotipo IgG2a está ligado con los mecanismos que se regulan a través de su unión con el receptor Fc-gamma (FcγR) como la fagocitosis de microorganismos opsonizados, la liberación de mediadores inflamatorios y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Al mismo tiempo, IgG2a es el principal isotipo fijador del complemento en el ratón. En términos generales, se ha establecido que IgG2a tiene las mismas propiedades que IgG2b. De hecho, tanto IgG2a como IgG2b son capaces de fijar el complemento (Abbas, 2015; Collins, 2016; Delves, 2016; Fazilleau *et al.*, 2009).

Por su parte, el isotipo IgG2b, cuya producción se promueve mediante el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) en el ratón, esta frecuentemente asociado como parte de la respuesta inmune independiente de células T. De hecho, IgG2b funciona conjuntamente con los anticuerpos IgG3 en el establecimiento de una respuesta temprana, principalmente cuando la ayuda por parte de las células T está limitada: IgG3 está encargada de iniciar el proceso inflamatorio a través de la fijación y activación de las cascadas del complemento y el reclutamiento de células inflamatorias, mientras que IgG2b promueve las funciones efectoras tempranas mediadas por el receptor FcγR (Baudino *et al.*, 2008; Collins, 2016; Damelang *et al.*, 2019; Fazilleau *et al.*, 2009; Vidarsson *et al.*, 2014).

Adicionalmente, se sabe IgG2b e IgG3 son clave en la respuesta inmune contra antígenos T independientes, por ejemplo, el LPS (Delves, 2016). Dado que las OMV contienen diversas moléculas de superficie de las células bacterianas que las

secretan ancladas a sus membranas externas como se explicó con anterioridad, el alto título del isotipo IgG2b concordante con los resultados obtenidos a partir de este estudio, podría deberse a la vasta presencia de LPS en la superficie de las microvesículas considerando que esta molécula es, de igual forma, uno de los factores de virulencia más importantes de *K. pneumoniae*. De la misma forma, la alta producción de IgG2b permitiría inferir que la inmunización con microvesículas de *K. pneumoniae* sería capaz de activar al subgrupo Th17 el cual es promovido por TGF- $\beta$ . Las células Th17 son capaces de mediar las respuestas a bacterias y hongos extracelulares a través de la producción de IL-2 e IL-17 encargada del reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, además, de que promueve la eliminación de bacterias mediada por macrófagos (Delves, 2016; Fazilleau *et al.*, 2009; Higgins *et al.*, 2019).

En cuanto a los anticuerpos IgG1 murinos, su función es limitar los procesos inflamatorios impulsados por los demás isotipos IgG mediante su interacción con el receptor Fc inhibitor Fc $\gamma$ RIIb. Asimismo, IgG1 no activa la vía proinflamatoria del complemento, evitando que otros isotipos de IgG se unan a C1q, al mismo tiempo que suprime las cascadas del receptor 5a del complemento. Además, es incapaz de desencadenar funciones efectoras mediadas por Fc $\gamma$ R. Por lo que el IgG1 murino contribuye a las respuestas inmunitarias antiinflamatorias. En etapas tardías de la respuesta inmune, el cambio de isotipo IgG1 de ratón conduce a la producción de IgE (Abbas, 2015; Collins, 2016; Delves, 2016; Fazilleau *et al.*, 2009; Higgins *et al.*, 2019).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que las microvesículas de la cepa KpBUAP021 podrían ser capaces de inducir una respuesta inmune mixta Th1/Th2/Th17, lo que sugiere la activación de una respuesta inmune tanto humoral como celular contra estas OMV. Además, los resultados muestran que las microvesículas KpBUAP021 son capaces de inducir una activación específica de la respuesta inmune celular mediada por los anticuerpos del tipo IgG, especialmente IgG2a, IgG2b e IgG3 que sesgan la respuesta al tipo Th1, así como la inmunidad humoral mediada por la producción de los isotipos IgG1 correspondiente al

subgrupo Th2. En contraste, las microvesículas de la cepa de referencia “ATCC” no patógena, son incapaces de activar una respuesta cuantificable por parte del sistema inmune.

La respuesta Th1/Th2/Th17 es coherente con las respuestas informadas anteriormente en otros estudios. Estudios previos demostraron que la inmunización por vía intraperitoneal en ratones de las cepas C57BL/6 y BALB/c con microvesículas de *E. coli* ofrece un efecto protector contra la letalidad inducida por bacterias, además de prevenir la sepsis y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica a través de las respuestas Th1 y Th17 donde la inmunidad protectora contra las microvesículas se atribuyó en gran parte a la estimulación de las células T dependientes de IFN- $\gamma$  e IL-17, en lugar de la inmunidad humoral mediada por las células B, ya que aun en ratones knockout deficientes para IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-4 la capacidad de las células B para producir anticuerpos IgG1 e IgG2a se conservó (Kim *et al.*, 2013). Por otra parte, en años más recientes, se comprobó que la inmunización de ratones hembra BALB/c por vía subcutánea con una vacuna candidata basada en microvesículas de *B. pertussis* resulta en la estimulación de una respuesta sistémica mixta Th1/Th2/Th17 demostrando niveles más altos de anticuerpos de tipo IgG, con un isotipo IgG1 dominante después de la primera inmunización y un cambio a IgG3 después de la inmunización de refuerzo, así como una baja respuesta inflamatoria reflejada en una disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias en comparación con una vacuna de células enteras reactogénica clásica, lo que enfatiza el potencial de las vacunas basadas en OMV (Raeven *et al.*, 2016).

En otro estudio, la inmunización intramuscular en ratones hembra ICR con microvesículas de un aislado clínico de *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos, generó altos niveles de anticuerpos IgG específicos, principalmente IgG2a y en menor proporción IgG1, indicando fuertes respuestas por parte de la inmunidad de tipo Th1. Además, la inmunización con OMV brindó protección a los ratones contra el desafío intranasal con *A. baumannii*, mediado por una rápida respuesta de anticuerpos IgA e IgG de la mucosa de las vías respiratorias, así como

contra bacterias homólogas y otros aislados clínicos clonalmente distintos en un modelo de sepsis y neumonía, donde los niveles elevados de IL-33 e IL-13 sesgaron la respuesta a una de tipo Th2, mientras que disminuyó significativamente la acumulación de citocinas inflamatorias reduciendo la carga bacteriana en fluidos de lavado broncoalveolar, pulmón y bazo (Huang *et al.*, 2014)

Finalmente, en cuanto a la inmunización de microvesículas secretadas por *K. pneumoniae*, un estudio previo titulado “Vacunación con vesículas extracelulares derivadas de *Klebsiella pneumoniae* protege contra la letalidad inducida por bacterias a través de la inmunidad humoral y celular” realizado por Lee y colaboradores se demostró que la inmunización por vía intraperitoneal de OMVs derivadas de *K. pneumoniae* induce una respuesta por parte de la inmunidad innata y adaptativa en ratones hembra C57BL/6. Se evidenció que después de la inmunización de OMV se genera un aumento significativo de anticuerpos específicos, principalmente IgG. Así mismo, en este estudio se evaluó la respuesta específica de las células T a las OMV, obteniendo una mejora significativa en cuanto la estimulación de IFN- $\gamma$  producida por las células Th1 en aquellos ratones vacunados. Además, se demostró que existe una mejora en la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-4 en células CD4+ producto de la inmunización. Todos los ratones inmunizados con OMV sobrevivieron al reto bacteriano mostrando una mejoría en el porcentaje de sobrevivencia, con un aumento en la dosis inmunizada alcanzando el 100% después de la vacunación con 1  $\mu$ g. Adicionalmente, el tratamiento de APC, específicamente de macrófagos con estas OMV, indicó que estas células fueron capaces de internalizar a las OMV induciendo eficazmente la producción de citocinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$  así como un aumento en la expresión del MHC-II y moléculas CD86. En conjunto, los resultados de ese estudio demuestran que las inmunizaciones con OMV derivadas de *K. pneumoniae* inducen una fuerte respuesta de células Th1 productoras de IFN- $\gamma$ , además de respuestas Th17 y Th2 contra los antígenos presentes en estas microvesículas (Lee *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la inmunización con las OMV derivadas de *K. pneumoniae* proporciona una excelente alternativa para el desarrollo de vacunas seguras, eficaces y de fácil producción para permitir el control y la disminución de la incidencia de las infecciones bacterianas producidas por *K. pneumoniae*. A partir de los resultados obtenidos, y con base en la información reportada en diversos estudios previos, se propone que el posible mecanismo inmunológico generado por la inmunización del modelo murino con las OMV derivadas de la cepa KpBUAP021 comienza con el reconocimiento de las microvesículas por parte de las células presentadoras de antígenos principalmente macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Estas células, al procesarlas, desencadenan la liberación de diversas citocinas, principalmente de tipo proinflamatorio. Análogamente, esta respuesta química, producida por la activación de estas APC, induce una respuesta inmune adaptativa mediante la activación linfocitos T y B. Por su parte, los linfocitos T, al entrar en contacto con las APC que presentan los antígenos de las microvesículas en su superficie, pueden diferenciarse en cualquiera de los tres subtipos principales: Th1, Th2 y Th17, dependiendo del ambiente de citocinas presente en el entorno. Esta diferenciación contribuye a la inmunidad adaptativa celular. De igual forma, las APC pueden estimular la activación de las células B encargadas de producir anticuerpos, mediando así, la respuesta inmune humoral (Figura 11).

No obstante, el desarrollo de plataformas vacunales basadas en microvesículas es relativamente nuevo, lo que implica que es necesario el desarrollo de diversos análisis así como la determinación de diversos parámetros como la dosis, vía de administración óptima y la reducción de su toxicidad atribuida a su composición proporcionando una seguridad en estas vacunas para poder ser utilizadas ampliamente en humanos.



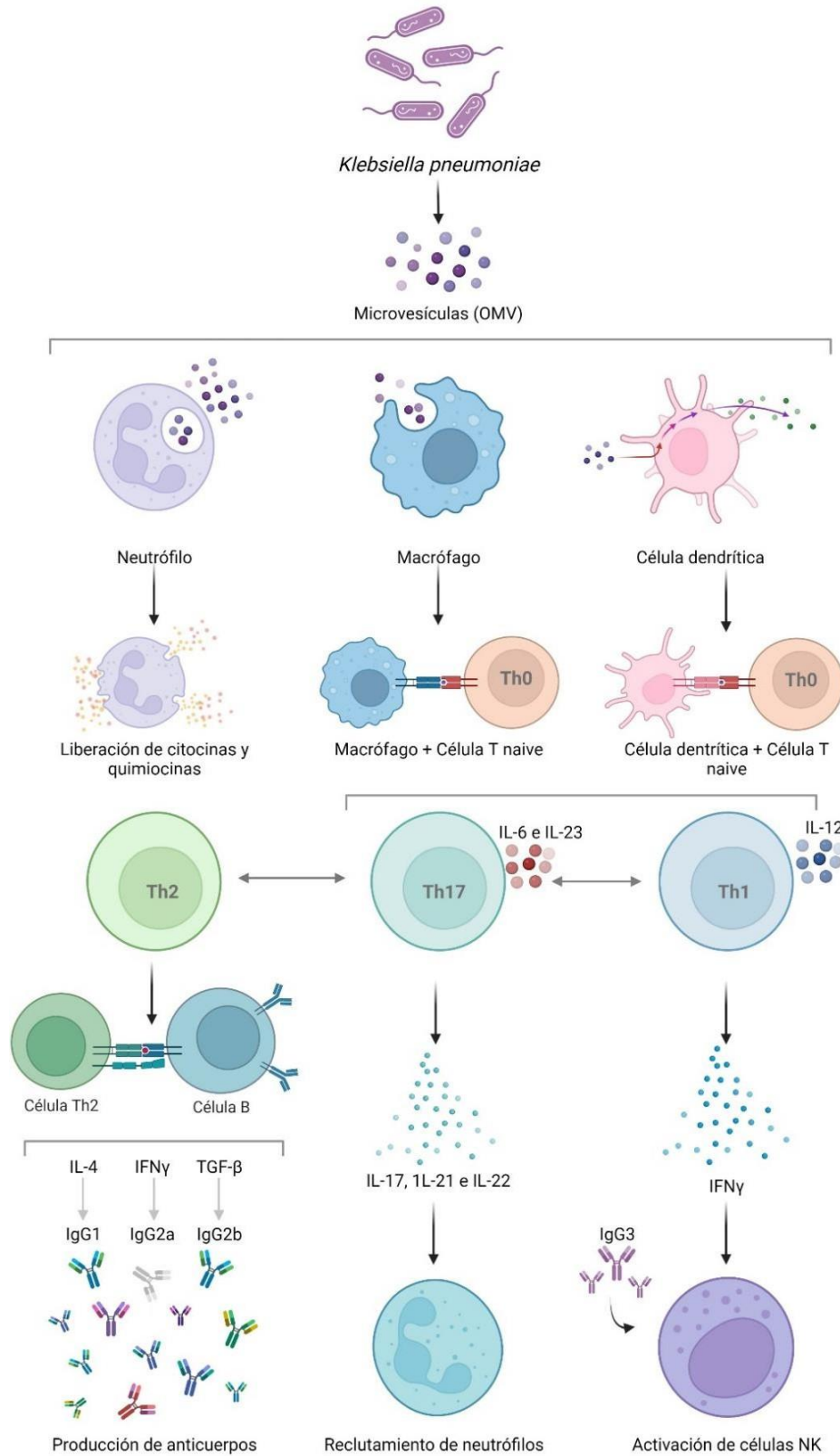


Figura 11. Mecanismo inmunológico propuesto en este estudio para las microvesículas aisladas de *Klebsiella pneumoniae*. Creado con BioRender.com

## 9. CONCLUSIONES

La inmunización por vía intraperitoneal con microvesículas de la cepa KpBUAP021 de *K. pneumoniae* en el modelo murino BALB/c favoreció la producción de anticuerpos policlonales específicos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 demostrando que las proteínas asociadas a las OMV KpBUAP021 son inmunogénicas, capaces de activar una respuesta inmune específica humoral y celular de tipo mixta Th1/Th2.

Por lo tanto, las OMV representan una herramienta prometedora para el desarrollo de vacunas de próxima generación contra infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* y algunas otras bacterias Gramnegativas.

## 10. PERSPECTIVAS

- Analizar las proteínas presentes en el cargo molecular y determinar su participación en la generación de anticuerpos contra las OMV de *K. pneumoniae*.
- Analizar el uso de las microvesículas como una plataforma vacunal que permita el desarrollo de nuevas terapias contra infecciones bacterianas multidrogorresistentes.
- Diseñar microvesículas con diversos antígenos homólogos entre enterobacterias que permita generar vacunas multivalentes contra diversas infecciones generadas por bacterias Gramnegativas.
- Evaluar la protección conferida por medio de la inmunización intraperitoneal con microvesículas de *K. pneumoniae* a través del reto bacteriano.
- Demostrar la capacidad intrínseca adyuvante de las OMV para activar la respuesta inmune humoral y celular formulando una vacuna sin la utilización adicional de adyuvantes.
- Caracterizar el tipo de citocinas producidas por la inmunización de microvesículas que permitan determinar con exactitud las respuestas inmunes generadas así como la subclase predominante de linfocitos T activados.

## 11. PRESENTACIONES ACADÉMICAS

- 1er. Lugar en el **XXXIX Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica “Dr. Armando Rentería Cárdenas”** organizado por la Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica con el proyecto: “Caracterización molecular e inmunológica de microvesículas secretadas de *Klebsiella pneumoniae*” de Trabajos Libres en la Categoría de Investigación Básica. Junio, 2021.
- Participación en el **XXXIX Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica “Dr. Armando Rentería Cárdenas”** organizado por la Asociación Mexicana de Infectología Pediátrica con el proyecto: “Caracterización molecular e inmunológica de microvesículas secretadas de *Klebsiella pneumoniae*” en la presentación de trabajos libres en la modalidad poster y presentación oral. Junio, 2021.
- Participación en el **SEGUNDO ENCUENTRO ESTATAL DE JÓVENES INVESTIGADORES 2021: MODALIDAD VIRTUAL** organizado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla “CONCYTEP” con el proyecto: “Las microvesículas secretadas de *Klebsiella pneumoniae* son inmunogénicas: posible aplicación como nano-plataformas para el desarrollo de vacunas”. Agosto, 2021.
- Participación en el concurso de Trabajos Libres del **3er. Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas y XXIV Semana del Día del Químico** organizado por la Universidad de Sonora a través del departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias con el proyecto: “Microvesículas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* y su impacto en la respuesta inmune al administrarlas a un modelo murino por vía intraperitoneal”. Modalidad en línea, noviembre 2020.

- Participación como proyecto de investigación con el título: "Evaluación de anticuerpos generados por la inmunización de microvesículas purificadas de *Klebsiella pneumoniae* en el modelo murino" en el programa "**Haciendo Ciencia en la BUAP Otoño XI**" en 2019.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Cellular and Molecular Immunology* (8va. edición). Elsevier.
- Ahmad, T. A., El-Sayed, L. H., Haroun, M., Hussein, A. A., & El Ashry, E. S. H. (2012). Development of immunization trials against *Klebsiella pneumoniae*. *Vaccine*, *30*(14), 2411–2420. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.027>
- Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C., & Cookson, B. T. (2007). Membrane Vesicles Are Immunogenic Facsimiles of *Salmonella typhimurium* That Potently Activate Dendritic Cells, Prime B and T Cell Responses, and Stimulate Protective Immunity In Vivo. *The Journal of Immunology*, *179*(11), 7692–7701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7692>
- Al-Tawfiq, J. A., & Tambyah, P. A. (2014). Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *Journal of Infection and Public Health*, *7*(4), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.04.003>
- Anand & Chaudhuri (2016). Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Molecular Membrane Biology*, *33*(6–8), 125–137. <https://doi.org/10.1080/09687688.2017.1400602>
- Arenas, N. E., Gutiérrez, A. J., Salazar, L. M., Polanco, J. C., & Gómez, A. (2009). Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. *Revista Ciencias de La Salud*, *7*(2), 22–29.
- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., & Grajales-Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Microorganisms Responsible of Nosocomial Infections in the Instituto Mexicano Del Seguro Social.*, *54*(1), 20–24. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=112752580&lang=es&site=ehost-live>

- Armstrong, J. P., Holme, M. N., & Stevens, M. M. (2017). Re-Engineering Extracellular Vesicles as Smart Nanoscale Therapeutics. In *ACS Nano* (Vol. 11, Issue 1, pp. 69–83). <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07607>
- Ashurst JV, Dawson A. Klebsiella Pneumonia. [Updated 2022 Feb 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
- Assoni, L., Girardello, R., Converso, T. R., & Darrieux, M. (2021). Current Stage in the Development of *Klebsiella pneumoniae* Vaccines. In *Infectious Diseases and Therapy* (Vol. 10, Issue 4, pp. 2157–2175). <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00533-4>
- Avila-Calderón, E. D., Lopez-Merino, A., Jain, N., Peralta, H., López-Villegas, E. O., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Witonsky, S., & Contreras-Rodríguez, A. (2012). Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 13. <https://doi.org/10.1155/2012/352493>
- Avila-Calderón, E. D., Ruiz-Palma, M. del S., Aguilera-Arreola, M. G., Velázquez-Guadarrama, N., Ruiz, E. A., Gomez-Lunar, Z., Witonsky, S., & Contreras-Rodríguez, A. (2021). Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12, p. 557902). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
- Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control: IC*, 6(2), 52–58. <https://doi.org/10.1017/s0195941700062603>
- Balhuizen, M. D., Veldhuizen, E. J. A., & Haagsman, H. P. (2021). Outer Membrane Vesicle Induction and Isolation for Vaccine Development. *Frontiers in Microbiology*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629090>
- Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A., & Giacobbe, D. R. (2019). Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 6, p. 74). <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00074>

- Bassetti, M., & Righi, E. (2015). New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections. *Current Opinion in Critical Care*, 21(5), 402–411. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000235>
- Baudino, L., Shinohara, Y., Nimmerjahn, F., Furukawa, J.-I., Nakata, M., Martínez-Soria, E., Petry, F., Ravetch, J. V., Nishimura, S.-I., & Izui, S. (2008). Crucial Role of Aspartic Acid at Position 265 in the CH2 Domain for Murine IgG2a and IgG2b Fc-Associated Effector Functions. *The Journal of Immunology*, 181(9), 6664–6669. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6664>
- Bauman, S. J., & Kuehn, M. J. (2006). Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes and Infection*, 8(9–10), 2400–2408. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.05.001>
- Benkő, R., Gajdács, M., Matuz, M., Bodó, G., Lázár, A., Hajdú, E., Papfalvi, E., Hannauer, P., Erdélyi, P., & Pető, Z. (2020). Prevalence and antibiotic resistance of escape pathogens isolated in the emergency department of a tertiary care teaching hospital in Hungary: A 5-year retrospective survey. *Antibiotics*, 9(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090624>
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C., Raina, S., & Llobès, R. (1998). *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4872–4878. <https://doi.org/10.1128/jb.180.18.4872-4878.1998>
- Bertrand, S. (2013). Estructura y Funcion de la Celula Bacteriana [Diapositivas]. SlideShare. <https://bit.ly/3v1r2mf>
- Bjune, G., H o i by, E. A., Gr o nnesby, J. K., Arnesen, O., Fredriksen, J. H., Lindbak, A. K., N o kleby, H., Rosenqvist, E., Solberg, L. K., Closs, O., Fr o holm, L. O., Lystad, A., Bakketeig, L. S., Hareide, B., Halstensen, A., Holten, E., & Eng, J. (1991). Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *The Lancet*, 338(8775), 1093–1096. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91961-S](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91961-S)



- Boev, C., & Kiss, E. (2017). Hospital-Acquired Infections: Current Trends and Prevention. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(1), 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2016.09.012>
- Cai, W., Kesavan, D. K., Wan, J., Abdelaziz, M. H., Su, Z., & Xu, H. (2018). Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based. *Diagnostic Pathology*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0768-y>
- Canada Communicable Disease report & Government of Canada. (2019). Healthcare-associated infection rates in Canadian hospitals. Canada Communicable Disease report (CCDR). Recuperado 2 de noviembre de 2021, de <https://bit.ly/3pmpB8H>
- Castañeda-Martínez, F. C., & Valdespino-Padilla, M. G. (2015). Prevalencia de infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel de atención en México. *Aportaciones Originales Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53(6), 686–690. [http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista\\_medica/article/viewFile/98/235](http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/article/viewFile/98/235)
- Carabarin-Lima, A., León-Izurieta, L., del Carmen Rocha-Gracia, R., Castañeda-Lucio, M., Torres, C., Gutiérrez-Cazarez, Z., González-Posos, S., Martínez de la Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., & Lozano-Zarain, P. (2016). First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of Medical Microbiology*, 65(8), 729–737. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000291>
- Cardo, D., Dennehy, P. H., Halverson, P., Fishman, N., Kohn, M., Murphy, C. L., & Whitley, R. J. (2010). Moving toward Elimination of Healthcare-Associated Infections: A Call to Action. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(11), 1101–1105. <https://doi.org/10.1086/656912>
- Caruana, J. C., & Walper, S. A. (2020). Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions. In *Frontiers*

*in Microbiology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00432>

Catalán-Nájera, J. C., Garza-Ramos, U., & Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? In *Virulence* (Vol. 8, Issue 7, pp. 1111–1123). <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>

Cecil, J. D., O'Brien-Simpson, N. M., Lenzo, J. C., Holden, J. A., Singleton, W., Perez-Gonzalez, A., Mansell, A., & Reynolds, E. C. (2017). Outer membrane vesicles prime and activate macrophage inflammasomes and cytokine secretion in vitro and in vivo. *Frontiers in Immunology*, 8(AUG), 1017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01017>

Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Healthcare-Associated Infections (HAIs). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recuperado 17 de enero de 2022, de <https://www.cdc.gov/hai/data/index.html>

Chatterjee, S. N., & Chaudhuri, K. (2011). Outer Membrane Vesicles of Bacteria. In *Springer Briefs in Microbiology*.

Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1–11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>

Choi, M., Tennant, S. M., Simon, R., & Cross, A. S. (2019). Progress towards the development of *Klebsiella* vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 18(7), 681–691. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1635460>

Collins, A. M. (2016). IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunology and Cell Biology*, 94(10), 949–954. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.65>

Damelang, T., Rogerson, S. J., Kent, S. J., & Chung, A. W. (2019). Role of IgG3 in Infectious Diseases. *Trends in Immunology*, 40(3), 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.005>

- Danasekaran, R., Mani, G., & Annadurai, K. (2014). Prevention of healthcare-associated infections: protecting patients, saving lives. *International Journal of Community Medicine and Public Health*, 1(1), 67. <https://doi.org/10.5455/2394-6040.ijcmph20141114>
- Dancer, S. J. (2014). Controlling hospital-acquired infection: Focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 665–690. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-14>
- Daza Pérez, R. . (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ormación Terapeutica Del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57–67. <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- De, S. N. (1959). Enterotoxicity of Bacteria-free Culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature*.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2016). Roitt's Essential Immunology (13th edition) [Libro electrónico]. Wiley.
- DGE, & SSA. (2016). Informe anual 2015. RHOVE. *Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE)*, 1, 1–61. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015>
- Doi, Y. (2019). Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 69(S7), S565–S575. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>
- Durand, V., MacKenzie, J., de Leon, J., Mesa, C., Quesniaux, V., Montoya, M., Le Bon, A., & Wong, S. Y. C. (2009). Role of lipopolysaccharide in the induction of type I interferon-dependent cross-priming and IL-10 production in mice by meningococcal outer membrane vesicles. *Vaccine*, 27(13), 1912–1922. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.109>
- Echeverri, L. M., & Cataño, J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: Epidemiología y resistencia. In *Iatreia* (Vol. 23, Issue 3, pp.

240–249).

- Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M. F., Wine, E., & Feldman, M. F. (2016). LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in salmonella. *MBio*, 7(4), 940–956. <https://doi.org/10.1128/mBio.00940-16>
- 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>
- Ellis, T. N., Leiman, S. A., & Kuehn, M. J. (2010). Naturally Produced Outer Membrane Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Elicit a Potent Innate Immune Response via Combined Sensing of Both Lipopolysaccharide and Protein Components. *INFECTION AND IMMUNITY*, 78(9), 3822–3831. <https://doi.org/10.1128/IAI.00433-10>
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L. J., & McHeyzer-Williams, M. G. (2009). Follicular Helper T Cells: Lineage and Location. *Immunity*, 30(3), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.003>
- Furuyama, N., & Sircili, M. P. (2021). Outer membrane vesicles (OMVs) produced by gram-negative bacteria: Structure, functions, biogenesis, and vaccine application. In *BioMed Research International* (Vol. 2021). <https://doi.org/10.1155/2021/1490732>
- GV, S., HC, C., NM, V., IL, G., PL, I., PF, S., GV, C., CO, R., CR, R., & MH, T. (1991). Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Annals*, 14(2), 195–207; discussion 208. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1812432/>
- György, B., Hung, M. E., Breakefield, X. O., & Leonard, J. N. (2015). Therapeutic applications of extracellular vesicles: Clinical promise and open questions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55, 439–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124630>

- Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., & Bakar, M. A. (2018). Health care-associated infections – An overview. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 11, pp. 2321–2333). <https://doi.org/10.2147/IDR.S177247>
- Haurat, M. F., Elhenawy, W., & Feldman, M. F. (2015). Prokaryotic membrane vesicles: New insights on biogenesis and biological roles. *Biological Chemistry*, *396*(2), 95–109. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0183>
- Higgins, B. W., McHeyzer-Williams, L. J., & McHeyzer-Williams, M. G. (2019). Programming Isotype-Specific Plasma Cell Function. *Trends in Immunology*, *40*(4), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.012>
- Holden, V. I., Breen, P., Houle, S., Dozois, C. M., & Bachman, M. A. (2016). *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 $\alpha$  stabilization during pneumonia. *MBio*, *7*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01397-16>
- Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J., & Rosenqvist, E. (2009). Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, *27*(SUPPL. 2), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.071>
- Holst, J., Oster, P., Arnold, R., Tatley, M. V., Næss, L. M., Aaberge, I. S., Galloway, Y., McNicholas, A., O'Hallahan, J., Rosenqvist, E., & Black, S. (2013). Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV) Lessons from past programs and implications for the future. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1241–1253). <https://doi.org/10.4161/hv.24129>
- Hornick, D. B., Allen, B. L., Horn, M. A., & Clegg, S. (1992). Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infection and Immunity*, *60*(4), 1577–1588. <https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1577-1588.1992>
- Huang, W., Wang, S., Yao, Y., Xia, Y., Yang, X., Li, K., Sun, P., Liu, C., Sun, W., Bai, H., Chu, X., Li, Y., & Ma, Y. (2016). Employing *Escherichia coli*-derived

- outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infection. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37242>
- Huang, W., Yao, Y., Long, Q., Yang, X., Sun, W., Liu, C., Jin, X., Li, Y., Chu, X., Chen, B., & Ma, Y. (2014). Immunization against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. *PLOS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100727>
- Hughes, R. G. (ed. . (2008). Patient Safety and Quality: An Evidence-Based Handbook for Nurses. *Agency for Healthcare Research and Quality; AHRQ, Vol. 2*(Cap. 41), 547–576. <https://doi.org/10.1016/j.aorn.2007.11.013>
- Iwahi, T., Abe, Y., Nakao, M., Imada, A., & Tsuchiya, K. (1983). Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli* in mice. *Infection and Immunity*, 39(3), 1307–1315. <https://doi.org/10.1128/iai.39.3.1307-1315.1983>
- Jagannadham, M. V., & Chattopadhyay, M. K. (2015). Role of outer membrane vesicles of bacteria. *Resonance*, 20(8), 711–725. <https://doi.org/10.1007/s12045-015-0228-x>
- Jahromi, L. P., & Fuhrmann, G. (2021). Bacterial extracellular vesicles: Understanding biology promotes applications as nanopharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.012>
- Jameson, J. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., & Loscalzo, J. (2018). Harrison's Principles of Internal Medicine: Vol. Vols. 1 & 2 (Twentieth Edition ed.) [Libro electrónico]. McGraw-Hill Education.
- Jan, A. T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>
- Kao, D., Lux, A., Schaffert, A., Lang, R., Altmann, F., & Nimmerjahn, F. (2017). IgG

subclass and vaccination stimulus determine changes in antigen specific antibody glycosylation in mice. *European Journal of Immunology*, 47(12), 2070–2079. <https://doi.org/10.1002/eji.201747208>

Kaparakis-Liaskos, M., & Ferrero, R. L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 375–387. <https://doi.org/10.1038/nri3837>

Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (Vol. 7, Issue 5, pp. 478–482). <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>

Kim, O. Y., Hong, B. S., Park, K.-S., Yoon, Y. J., Choi, S. J., Lee, W. H., Roh, T.-Y., Lötval, J., Kim, Y.-K., & Gho, Y. S. (2013). Immunization with Escherichia coli Outer Membrane Vesicles Protects Bacteria - Induced Lethality via Th1 and Th17 Cell Responses . *The Journal of Immunology*, 190(8), 4092–4102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200742>

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>

Kroniger, T., Otto, A., & Becher, D. (2018). Proteomic analysis of bacterial (outer) membrane vesicles: progress and clinical potential. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 15, Issue 8, pp. 623–626). <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1505509>

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

Kulkarni, H. M., & Jagannadham, M. V. (2014). Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology (United Kingdom)*, 160, 2109–2121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079400-0>

- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological Functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>
- Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Functions and Biogenesis of OMVs. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>. Biological
- Lapinet, J. A., Scapini, P., Calzetti, F., Pérez, O., & Cassatella, M. A. (2000). Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-8, macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer me. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6917–6923. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6917-6923.2000>
- Lee, J. C., Lee, E. J., Lee, J. H., Jun, S. H., Choi, C. W., Kim, S. II, Kang, S. S., & Hyun, S. (2012). Klebsiella pneumoniae secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiology Letters*, *331*(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02549.x>
- Lee, W. H., Choi, H. II, Hong, S. W., Kim, K. S., Gho, Y. S., & Jeon, S. G. (2015). Vaccination with Klebsiella pneumoniae-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Experimental and Molecular Medicine*, *47*(9), 183. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.59>
- 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, M., Zhou, H., Yang, C., Wu, Y., Zhou, X., Liu, H., & Wang, Y. (2020). Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. *Journal of Controlled Release*, *323*(December 2019), 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.031>
- Li, R., & Liu, Q. (2020). Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles as



Multifunctional Delivery Platforms. In *Frontiers in Materials* (Vol. 7, p. 202).  
<https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00202>

Li, Z., Clarke, A. J., & Beveridge, T. J. (1998). Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *Journal of Bacteriology*, *180*(20), 5478–5483. <https://doi.org/10.1128/jb.180.20.5478-5483.1998>

Lister, J. (1876). ANTISEPTIC PRINCIPLE IN THE PRACTICE OF SURGERY. *The Lancet*.

López-Vargas, J. A., & Echeverri, L. M. (2010). *Epidemiología Y Mecanismos De Resistencia*. *23*(2), 157–165.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v23n2/v23n2a7.pdf>

Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S. M., Thompson, D. L., Wilson, L. E., & Fridkin, S. K. (2014). Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *New England Journal of Medicine*, *370*(13), 1198–1208. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1306801>

Martora, F., Pinto, F., Folliero, V., Cammarota, M., Dell’Annunziata, F., Squillaci, G., Galdiero, M., Morana, A., Schiraldi, C., Giovane, A., Galdiero, M., & Franci, G. (2019). Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of *Klebsiella pneumoniae* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, *136*(July), 103719. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103719>

McMahon, K. J., Castelli, M. E., Vescovi, E. G., & Feldman, M. F. (2012). Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *Journal of Bacteriology*, *194*(12), 3241–3249. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-12>

Miró-Canturri, A., Ayerbe-Algaba, R., & Smani, Y. (2019). Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, *10*.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00041>

- Morton, D. B., Jennings, M., & Buckwell, A. (2001). Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals*, 35(1), 1–41. <https://doi.org/10.1258/0023677011911345>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016–2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nakamura, H. (2013). BALB/c Mouse. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9>
- Nieves, W., Asakrah, S., Qazi, O., Brown, K. A., Kurtz, J., Aucoin, D. P., Mclachlan, J. B., Roy, C. J., & Morici, L. A. (2011). A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary Burkholderia pseudomallei infection. *Vaccine*, 29(46), 8381–8389. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.058>
- Nodarse H., R. (2002). Visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(3), 201–208.
- Ojima, Y., Nguyen, M. H., Yajima, R., & Taya, M. (2015). Flocculation of Escherichia coli cells in association with enhanced production of outer membrane vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5900–5906. <https://doi.org/10.1128/AEM.01011-15>
- Oster, P., Lennon, D., O'Hallahan, J., Mulholland, K., Reid, S., & Martin, D. (2005). MeNZB™: A safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand Neisseria meningitidis serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine*, 23(17–18), 2191–2196. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.063>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/mubr.00078-15>
- Parker, M. T. (1978). *Hospital-acquired infections: Guidelines to laboratory methods*.

4. <https://doi.org/10.1136/jcp.32.8.858-c>

Pekow, C. A. (2012). Basic Experimental Methods in the Rabbit. In M. A. Suckow, K. A. Stevens, & R. P. B. T.-T. L. R. Wilson Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents (Eds.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 243–258). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-30495-X>

Perez Vidakovics, M. L. A., Jendholm, J., Mörgelin, M., Månsson, A., Larsson, C., Cardell, L. O., & Riesbeck, K. (2010). B cell activation by outer membrane vesicles - A novel virulence mechanism. *PLoS Pathogens*, 6(1), 1000724. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000724>

Petersen, H., Nieves, W., Russell-Lodrigue, K., Roy, C. J., & Morici, L. A. (2014). Evaluation of a Burkholderia Pseudomallei Outer Membrane Vesicle Vaccine in Nonhuman Primates. *Procedia in Vaccinology*, 8, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2014.07.007>

Petousis-Harris, H. (2018). Impact of meningococcal group B OMV vaccines, beyond their brief. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 14, Issue 5, pp. 1058–1063). <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1381810>

Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 11, Issue 4, pp. 589–603). <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589>

Pringle, J. (1752). Observations on the Diseases of the Army in Camp and Garrison. London: A. Millar, and D. Wilson; and T. Payne.

Pujol, M., & Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(2), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.001>

Raeven, R. H. M., Brummelman, J., Pennings, J. L. A., Van Der Maas, L., Tilstra,

- W., Helm, K., Van Riet, E., Jiskoot, W., Van Els, C. A. C. M., Han, W. G. H., Kersten, G. F. A., & Metz, B. (2016). Bordetella pertussis outer membrane vesicle vaccine confers equal efficacy in mice with milder inflammatory responses compared to a whole-cell vaccine. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep38240>
- Rennert-May, E., Conly, J., Leal, J., Smith, S., & Manns, B. (2018). Economic evaluations and their use in infection prevention and control: A narrative review. In *Antimicrobial Resistance and Infection Control* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0327-z>
- Riedel, S., Morse, S., Mietzner, T., & Miller, S. (2020). Jawetz, Melnick & Adelberg. *Microbiología médica* (28a. edición). McGraw-Hill.
- Rodríguez S., M. (2018). Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México. *Boletín CONAMED*, 3(17), 16–20. [www.who.int/gpsc/background/es/index.html.%0Ahttp://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia\\_infecciones.pdf](http://www.who.int/gpsc/background/es/index.html.%0Ahttp://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia_infecciones.pdf)
- Rojas, N. (1995). El Lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. *Revista de Costa Rica. Ciencias Médicas*, 16, 71–84. <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v16n3/art8.pdf>
- Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 85(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62426-X](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62426-X)
- Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*, 19, 37–45. <https://doi.org/10.19052/mv.783>
- Roy, K., Hamilton, D. J., Munson, G. P., & Fleckenstein, J. M. (2011). Outer membrane vesicles induce immune responses to virulence proteins and protect against colonization by enterotoxigenic Escherichia coli. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11), 1803–1808. <https://doi.org/10.1128/CVI.05217-11>
- Ryan, K., Ahmad, N., Reller, B. L., Reller, M., Lagunoff, M., Drew, L. W., Weissman,

- S., Alspaugh, A. J., Sterling, C., & Pottinger, P. (2017). *Ryan & Sherris Medical Microbiology* (8th ed.) [Libro electrónico]. McGraw Hill / Medical.
- Sah, J. P., Shah, S. K., Sharma, B., Shah, M., Salahuddin, M., Mahato, R. V., Yadav, C., Razin, M. S., & Rashid, M. (2015). Siderophore production: A unique quality of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* to survive in low iron concentration. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 1(1), 130–138. <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v1i1.25509>
- Salazar Cuba, V. (2012). Infecciones intrahospitalarias. *Revista de La Sociedad Boliviana de Pediatría*, 51(3), 187–190.
- Salgado, P., Gilsanz, F., & Maseda, E. (2015). Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas. *Revista Española de Quimioterapia*, 28(1), 12–15.
- 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, 609–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-052821-031444>
- Schild, S., Nelson, E. J., & Camilli, A. (2008). Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infection and Immunity*, 76(10), 4554–4563. <https://doi.org/10.1128/IAI.00532-08>
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 10, pp. 605–619). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
- Schwechheimer, C., Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2014). Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiology*, 14(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0324-1>
- Secretaría de Salud. (2009). NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. *Diario Oficial de La Federación*.

- Selwyn, S. (1991). Hospital infection: the first 2500 years. *Journal of Hospital Infection*, 18(SUPPL. A), 5–64. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(91\)90004-R](https://doi.org/10.1016/0195-6701(91)90004-R)
- Shimizu, S. (2004). Routes of Administration. In *The Laboratory Mouse* (pp. 527–542). <https://doi.org/10.1201/9781315155807-1>
- Silverman, J. (2012). Biomedical Research Techniques. In M. A. Suckow, K. A. Stevens, & R. P. Wilson (Eds.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 779–795). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00029-8>
- Sin, J.-I., Kim, J. J., Boyer, J. D., Ciccarelli, R. B., Higgins, T. J., & Weiner, D. B. (1999). In Vivo Modulation of Vaccine-Induced Immune Responses toward a Th1 Phenotype Increases Potency and Vaccine Effectiveness in a Herpes Simplex Virus Type 2 Mouse Model. *Journal of Virology*, 73(1), 501–509. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.501-509.1999>
- Song, T., Mika, F., Lindmark, B., Liu, Z., Schild, S., Bishop, A., Zhu, J., Camilli, A., Johansson, J., Vogel, J., & Wai, S. N. (2008). A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Molecular Microbiology*, 70(1), 100–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x>
- Suleyman, G., Alangaden, G., & Bardossy, A. C. (2018). The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. In *Current Infectious Disease Reports* (Vol. 20, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0620-2>
- Talcott, M. R., Akers, W., & Marini, R. P. (2015). Techniques of Experimentation. In J. G. Fox, L. C. Anderson, G. M. Otto, K. R. Pritchett-Corning, & M. T. Whary (Eds.), *Laboratory Animal Medicine (Third Edition)* (Third Edit, pp. 1201–1262). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00025-0>
- Tan, K., Li, R., Huang, X., & Liu, Q. (2018). Outer membrane vesicles: Current status and future direction of these novel vaccine adjuvants. In *Frontiers in*

*Microbiology* (Vol. 9, Issue APR, p. 783).  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00783>

Timothy Prior, J., Davitt, C., Kurtz, J., Gellings, P., McLachlan, J. B., & Morici, L. A. (2021). Bacterial-derived outer membrane vesicles are potent adjuvants that drive humoral and cellular immune responses. *Pharmaceutics*, *13*(2), 1–11.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020131>

Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(1), 13–24.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>

Toyofuku, M., Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Kurosawa, M., & Nomura, N. (2015). Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, *226*(September 2015), 65–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.08.013>

van der Pol, L., Stork, M., & van der Ley, P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology Journal*, *10*(11), 1689–1706.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201400395>

Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., & Klinman, D. (2014). *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>

Voidazan, S., Albu, S., Toth, R., Grigorescu, B., Rachita, A., & Moldovan, I. (2020). Healthcare associated infections—a new pathology in medical practice? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(3), 760.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph17030760>

Wang, S., Gao, J., & Wang, Z. (2019). Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *11*(2). <https://doi.org/10.1002/wnan.1523>

WHO. (2002). Prevention of Hospital-Acquired Infections. *World Health*

*Organization, 2nd editio.* <https://bit.ly/3nmlqrA>

WHO. (2005). World Alliance for Patient Safety: Reto Mundial en Pro de la Seguridad del Paciente. *World Alliance for Patient Safety*, 53(9), 1689–1699.

WHO. (2016). Health care-associated infections. *Patient Safety. A World Alliance for Safer Health Care*, 37(4), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00238-013-0923-3>

World Health Organization. (2021). Antimicrobial resistance. World Health Organization (WHO). Recuperado 12 de noviembre de 2021, de <https://bit.ly/3hpK20f>

Wiltshire, A. (1870). THE LATE SIR JAMES Y. SIMPSON AND HOSPITALISM. *The Lancet*, 63.

Yang, Y., Hong, Y., Cho, E., Kim, G. B., & Kim, I. S. (2018). Extracellular vesicles as a platform for membrane-associated therapeutic protein delivery. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1440131>

Yeh, K. M., Kurup, A., Siu, L. K., Koh, Y. L., Fung, C. P., Lin, J. C., Chen, T. L., Chang, F. Y., & Koh, T. H. (2007). Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 466–471. <https://doi.org/10.1128/JCM.01150-06>

Zamora, M. B., Edecio, D., Zamora, S., & Pérez, V. M. (2015). Infección nosocomial. Un importante problema de salud a nivel mundial. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 62(1), 33–39.

Zhang, J., Zhao, J., Li, J., Xia, Y., & Cao, J. (2021). Outer membrane vesicles derived from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* stimulate the inflammatory response. *Microbial Pathogenesis*, 154(1), 104841. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104841>

Zhao, K., Deng, X., He, C., Yue, B., & Wu, M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*



outer membrane vesicles modulate host immune responses by targeting the toll-like receptor 4 signaling pathway. *Infection and Immunity*, 81(12), 4509– 4518. <https://doi.org/10.1128/IAI.01008-13>

Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642484>

Zoutman, D. E., Ford, B. D., Bryce, E., Gourdeau, M., Hébert, G., Henderson, E., Paton, S., & Jarvis, W. R. (2003). The state of infection surveillance and control in Canadian acute care hospitals. *American Journal of Infection Control*, 31(5), 266–273. <https://doi.org/10.1067/mic.2003.88>

## 13. ANEXOS

### 13.1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Principales IAAS registradas en las instituciones hospitalarias de la RHOVE en 2015.	14
Tabla II. Principales agentes etiológicos identificados como agentes causales de las IAAS en las instituciones hospitalarias adscritas a la RHOVE en 2015.	14
Tabla III. Principales microorganismos patógenos aislados de infecciones nosocomiales reportados a la RHOVE.	15
Tabla IV. Modelos de estudio de la formación de microvesículas	29
Tabla V. Protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford	55
Tabla VI. Esquema de inmunización por vía intraperitoneal	56
Tabla VII. Valores de absorbancia de los títulos de anticuerpos de cada suero con su respectiva desviación estándar.	57
Tabla VIII. Resumen de los datos obtenidos en el análisis estadístico ANOVA.	59
Tabla IX. Resultados del análisis de varianza ANOVA de una vía.	60
Tabla X. Desviación estándar de cada uno de los isotipos encontrados en los suero preinmune e hiperinmunes “ATCC” y “KpBUAP021”.	60

### 13.2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gramnegativas	17
Figura 2. Factores de virulencia presentes en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
Figura 3. Diagrama esquemático de una vesícula de membrana externa	24
Figura 4. Principales funciones que desempeñan las microvesículas	26
Figura 5. Mecanismo de formación de microvesículas en bacterias Gramnegativas	28
Figura 6. Aplicaciones biomédicas de las microvesículas	34
Figura 7. Inmunización por vía intraperitoneal en ratones	39
Figura 8. Crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> en LB líquido a las 72 horas donde se muestra la secreción de microvesículas al medio de cultivo	53

Figura 9. Microvesículas de la cepa “KpBUAP021” de *K. pneumoniae* purificadas mediante centrifugación diferencial y filtración en membrana de nylon resuspendidas en PBS a las 96 horas de crecimiento bacteriano\_\_\_\_\_54

Figura 10. Placa de ELISA donde se realizó la isotipificación usando el KIT ISO2 de SIGMA\_\_\_\_\_59

Figura 11. Mecanismo inmunológico propuesto en este estudio para las microvesículas aisladas de *Klebsiella pneumoniae*\_\_\_\_\_72

### 13.3. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica I. Títulos de anticuerpos totales de los sueros preinmune e hiperinmune “ATCC” y KpBUAP021\_\_\_\_\_58

Gráfica II. Isotipificación de sueros de ratones inmunizados con microvesículas purificadas de *K. pneumoniae* cepas “ATCC” y KpBUAP021” y suero preinmune usando KIT ISO2 de SIGMA\_\_\_\_\_61

### 13.4. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
a.C.	Antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AmpC	Serin-betalactamasas
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Células presentadoras de antígenos (por las siglas en inglés de Antigen-presenting cells)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
BSA	Albúmina de suero bovino

CAUTI	Infecciones del tracto urinario asociadas a catéter (por las siglas en inglés de Catheter-associated Urinary Tract Infections)
CCDR	Canada Communicable Disease Report
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (por las siglas en inglés de Centers For Disease Control And Prevention)
cKpn	<i>K. Pneumoniae</i> clásica
CLABSI	Infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la línea central (por las siglas en inglés de Central Line-associated Bloodstream Infection)
CPS	Polisacárido capsular
DC	Células dendríticas (por las siglas en inglés de Dendritic cells)
DGE	Dirección General de Epidemiología
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (por las siglas en inglés de European Centre for Disease Prevention and Control)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos de América
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (por las siglas en inglés de Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
EMA	Agencia Europea de Medicamentos (por las siglas en inglés de European Medicines Agency)
EPR	Efecto de permeación y retención mejorada
ESKAPE	Patógenos multidrogosresistentes: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter species</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (por las siglas en inglés de Food and Drug Administration)
HRP-goat anti-mouse IgG	Anticuerpo IgG anti-mouse marcados con peroxidasa de rábano
hvKpn	<i>K. Pneumoniae</i> hipervirulenta
IAAS	Infecciones Asociadas a La Atención de La Salud (HAI, por las siglas en inglés de Healthcare Associated Infection)
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelular-1
IFN $\beta$	Interferón- $\beta$

IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
Igs	Inmunoglobulinas
IIH	Infecciones intrahospitalarias
KDO	3-desoxi-D-manooctuosónico (por las siglas en inglés de ketodeoxyoctanoic acid)
KpBUAP021	Cepa de aislado clínico de <i>K. pneumoniae</i>
LB	Medio líquido Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MDRO	Microorganismos multidrogosresistentes
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitros
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (por las siglas en inglés de Major Histocompatibility Complex)
MIP-1 $\beta$	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (por las siglas en inglés de Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
nm	Nanómetros
NOM	Norma oficial mexicana
OM	Membrana externa (por las siglas en inglés outer membrane)
OMP	Proteínas de la membrana externa
OMS	Organización mundial de la Salud (WHO, por las siglas en inglés de World Health Organization)
OMV	Vesículas de membrana externa (OMV, por las siglas en inglés de Outer Membrane Vesicle)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer Fosfato Salino (por las siglas en inglés de Phosphate Buffered)
PBST	Disolución PBS-Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PEG	Polietilenglicol
PG	Peptidoglicano
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
rpm	Revoluciones por minuto
siRNA	ARN pequeño de interferencia (por las siglas en inglés de small interfering RNA)
spp.	Especies
SSA/SS	Secretaria de Salud
SSI	Infecciones del sitio quirúrgico (por las siglas en inglés de Surgical Site Infection)
Th1	Linfocitos T colaboradores de subgrupo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores de subgrupos 2
TLR	Receptor tipo Toll
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
US \$	Dólares estadounidenses
UV	Luz ultravioleta
VAP	Neumonía asociada a ventilador (por las siglas en inglés de Ventilator-associated Pneumonia)
VRE	Enterococos resistentes a la vancomicina (por sus siglas en inglés de Vancomycin-resistant Enterococci)
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ g/ml	Microgramo por mililitro
$\mu$ g/ $\mu$ l	Microgramo por microlitro

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL GENERADA POR LA  
INMUNIZACIÓN CON MICROVESÍCULAS SECRETADAS DE *Klebsiella*  
*pneumoniae*

**2022**