

Original article

Study of *Klebsiella pneumoniae* Vaccine Based on the Epitopes of Outer Membrane Proteins: An Immunoinformatic Approach

Hamid Vaez^{*1}, Mohammad Amin Sargazi¹, Ali Zeidabadi¹, Mohammadreza Javan²,
Farzad Khademi^{3,4}, Abbas Pishdadian²

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

2. Department of Immunology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

3. Department of Microbiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

4. Arthropod-Borne Diseases Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +985432225402, Fax: +985432232023, E-mail: h_vaez@zbmu.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Jul 10, 2025

Accepted: Sep 13, 2025

Keywords:

K. pneumonia

Bacterial Infections

Klebsiella Infections

Outer Membrane Proteins

Vaccine

ABSTRACT

Background: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) infections are usually considered life-threatening. Vaccination plays a crucial role in reducing the spread and mortality of infectious diseases. The present study aimed to investigate outer membrane protein K36 (OmpK36) and outer membrane protein X (OmpX) to identify suitable B-cell and T-cell epitopes for vaccine development against *K. pneumoniae* infections.

Methods: To identify suitable B-cell and T-cell epitopes, bioinformatics servers were utilized, including VaxiJen, IEDB, APP, ABCpred, ExPASy, and EMBOSS. Molecular and physicochemical characteristics, as well as human similarity, toxicity, and allergenicity of epitopes were investigated.

Results: The results of this study revealed that OmpK36 and OmpX are immunogenic. In total, 18 epitopes were identified, 13 for OmpK36 and 5 for OmpX. Exclusion criteria were applied, and eight epitopes were ultimately selected.

Conclusion: According to the results of this study, eight appropriate epitopes for B cells and T cells were proposed for vaccine design against *K. pneumoniae*. Further in vitro and in vivo studies are recommended before determining the use of epitopes.

How to cite this article: Vaez H, Sargazi M.A, Zeidabadi A, Javan M.R, Khademi F, Pishdadian A. Study of *Klebsiella pneumoniae* Vaccine Based on the Epitopes of Outer Membrane Proteins: An Immunoinformatic Approach. J Ardabil Univ Med Sci. 2025;25(1):74-89.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

Extended Abstract

Background: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is one of the most important members of the Enterobacteriaceae family and is the cause of a wide range of infections, such as urinary tract infections, bloodstream infections, and pneumonia. In recent years, the treatment of infections caused by *K. pneumoniae* has faced more limitations due to the increase in prevalence of antibiotic resistance mechanisms. Different mechanisms have been identified in *K. pneumoniae* that cause antibiotic resistance. For example, *K. pneumoniae* becomes resistant to multiple antibiotics such as cephalosporins and carbapenems by producing extended-spectrum beta-lactamases. In addition, *K. pneumoniae* strains are capable of producing various aminoglycoside-modifying enzymes, which confer resistance to different aminoglycosides, including gentamicin and amikacin. Outer membrane proteins X and K36 (OmpX and OmpK36) are important proteins and play an important role in *K. pneumoniae* pathogenesis by binding to host cells and forming biofilms. Given the high prevalence of infections caused by *K. pneumoniae* and serious restrictions in the use of antibiotics to treat related infections, as well as the lack of an approved *K. pneumoniae* vaccine, the present study aimed to investigate OmpK36 and OmpX to find appropriate B-cell and T-cell epitopes for vaccine development against *K. pneumonia* infections.

Methods: To find appropriate B-cell and T-cell epitopes, the following bioinformatics servers were used: VaxiJen, IEDB, APP, ABCpred, Expasy, and EMBOSS. Molecular and physicochemical characteristics, as well as human similarity, toxicity, and allergenicity of epitopes were investigated.

Results: Blast results showed that Ompk36 and OmpX proteins are conserved, with more than 98% similarity observed among different strains of *K. pneumoniae*. Linear epitopes of B lymphocytes were evaluated using IEDB and ABCpred servers. Figures 1 to 5 show the results of the evaluation of epitopes based on different features. Based on the results obtained from Figures 1 to 5, the final epitopes were selected (Table 1). To increase the

accuracy in selecting the final epitopes, the EMBOSS server was also used. The results of this server are shown in Table 2. To identify noncontinuous epitopes, a 3D model of the proteins was first prepared using the SWISS-MODEL server. The accuracy of the prepared model was confirmed using the QMEANDisCo and GMQE (Global Model Quality Estimate) parameters. In total, 18 epitopes were identified, 13 for OmpK36 and 5 for OmpX. Exclusion criteria were applied, and eight epitopes were ultimately selected. For OmpK36, epitopes were located in 36-50, 290-318, 254-267, and 162-177. For OmpX, epitopes were located in 80-95, 148-167, 101-116, and 6-23. The results obtained from various servers, such as IEDB, ABCpred, EMBOSS, Expasy, Ellipro, Discotope, and APP, were compared with each other and the final peptides were selected. Based on the BLAST results, no significant similarity was observed between the final peptides and human antigens. In addition, the toxicity and allergenicity of the final epitopes were negative. The results regarding the binding ability of the final peptides to MHC-I and MHC-II are shown in Tables 5 and 6. The selected final epitopes bind to different T lymphocytes and can therefore cause their activation.

Conclusion: In medicine, vaccination has always played an important role in preventing and reducing deaths from infectious diseases and has been used as a safe and reliable preventive method. Considering the important role of *K. pneumoniae* in causing various infections and also the serious limitations that exist due to the development of resistance mechanisms against antibiotics, the present study was conducted to identify epitopes that stimulate B and T lymphocytes. In this study, several validated bioinformatics tools were used to identify important epitopes of the OmpX and OmpK36 proteins that can stimulate B and T lymphocytes. A total of 8 peptides were identified for potential use in vaccination. These peptides have suitable physicochemical properties and can stimulate B and T lymphocytes; however, further studies must be conducted both in vitro and in vivo before any decision can be made.

مطالعه واکسن کلبسیلا پنومونیه بر اساس اپی توپ‌های پروتئین‌های غشای خارجی: یک رویکرد ایمونوانفورماتیک

حمید واعظ^{۱*}، محمد امین سرگزی^۱، علی زیدآبادی^۱، محمد رضا جوان^۲، فرزاد خادمی^۳، عباس پیشدادیان^۴

۱. گروه میکروپزشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

۲. گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

۳. گروه میکروپزشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از بندپایان، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۵۴۳۲۲۵۴۰۲ فاکس: ۰۵۴۳۲۲۳۲۰۲۳ پست الکترونیک: h_vaez@zbmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلا پنومونیه از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت در بیمارستان و جامعه می‌باشد. با توجه به اهمیت واکسیناسیون در کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی، هدف از این مطالعه بررسی اپی توپ‌های پروتئین‌های غشای خارجی X و K36 (Outer membrane protein X, Outer membrane protein K36) جهت طراحی واکسن ضد عفونت های کلبسیلا پنومونیه بود.

روش کار: در این مطالعه به منظور یافتن اپی توپ‌های مناسب تحریک کننده سیستم ایمنی (لنفوسیت B و T) از ابزارهای بیوانفورماتیک مختلف (مانند IEDB, Expasy, ABCpred, VaxiJen, EMBOSS) استفاده شد. پس از شناسایی اپی توپ‌های مناسب، سمیت، آلرژی‌زا بودن، شباهت به آنتی ژن‌های انسانی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین‌های مورد بررسی ایمونوژنیک بوده و می‌توانند به خوبی سیستم ایمنی را تحریک کنند. در مجموع، براساس توانایی تحریک لنفوسیت B، ۱۳ اپی توپ برای OmpK36 و ۵ اپی توپ برای OmpX شناسایی شدند. در نهایت، با در نظر گرفتن سایر معیارها مانند آنتی ژنیسیته، شکل فضایی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و اتصال به لنفوسیت‌های T، ۴ پپتید نهایی برای پروتئین OmpK36 و ۴ پپتید نهایی برای پروتئین OmpX انتخاب شدند.

نتیجه گیری: در این مطالعه در مجموع ۸ پپتید مناسب که می‌توانند لنفوسیت B و T را به خوبی تحریک کنند معرفی شدند. این پپتیدها ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسبی دارند و نتیجه آزمایش سمیت و آلرژی‌زا بودن برای آنها منفی بود. با این حال، قبل از تصمیم گیری برای استفاده از این پپتیدها به عنوان واکسن مطالعات بیشتری اعم از مطالعات In-vitro و In-vivo باید صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، عفونت‌های باکتریایی، عفونت‌های کلبسیلا، پروتئین‌های غشای خارجی، واکسن

دریافت: ۱۴۰۴/۴/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۲۲

مقدمه

وسیعی از عفونت‌ها مانند عفونت‌های ادراری، خونی،

زخم و پنومونی می‌باشد. در سال‌های اخیر به دلیل

افزایش مکانیسم‌های مقاومت، درمان عفونت‌های

کلبسیلا پنومونیه به عنوان یکی از مهمترین اعضای

خانواده انتروباکتریاسه شناخته می‌شود و عامل طیف

ناشی از کلبسیلا پنومونیه با محدودیت‌های بیشتری روبرو شده است [۱]. نتایج مطالعات جدید نشان داده است که قدرت بیماری‌زایی تمام گونه‌های کلبسیلا پنومونیه یکسان نیست. برخی از گونه‌ها که با عنوان کلبسیلا پنومونیه‌ها پیرویرولانت شناخته می‌شوند به دلیل داشتن فاکتورهای بیماری‌زای بیشتر از اهمیت بالاتری برخوردار هستند و معمولاً عفونت‌های ایجاد شده توسط آنها با مرگ و میر بالاتری همراه است [۲-۴].

سازوکارهای مختلفی در کلبسیلا پنومونیه شناخته شده است که باعث مقاومت آنتی بیوتیکی درباکتری می‌شود. به عنوان مثال کلبسیلا پنومونیه با تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در برابر آنتی بیوتیک‌های مختلف مانند سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها مقاوم می‌شود. همچنین با تولید آنزیم‌های آمینو گلیکوزید استیل ترانسفراز، آمینو گلیکوزید فسفوترانسفراز و یا آمینو گلیکوزید نوکلئوتید ترانسفراز در برابر آنتی بیوتیک‌های با طیف اثر گسترده مانند جنتامایسین و آمیکاسین مقاوم می‌شوند [۵-۶].

باتوجه به نقش مهم کلبسیلا پنومونیه در ایجاد عفونت‌های مختلف و همچنین محدودیت‌های جدی در استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ایجادشده، استفاده از واکسن می‌تواند نقش بسیار مهم و تاثیرگذاری در پیشگیری از عفونت‌های کلبسیلا پنومونیه در بیماران، مخصوصاً بیمارانی با فاکتورهای خطر ساز مانند سیستم ایمنی تضعیف شده و یا سابقه طولانی بستری در بیمارستان، داشته باشد [۷].

اولین واکسن برای مبارزه با کلبسیلا پنومونیه و کاهش میزان مرگ و میر با استفاده از کپسول باکتری در سال ۱۹۸۵ میلادی تهیه شد و تا سال ۱۹۸۸ واکسن ۲۴ گانه آن نیز تهیه شد، ولی این واکسن نتوانست رضایت کامل را ایجاد کند [۸]. واکسن‌های تهیه شده از سلول غیرفعال و سلول تضعیف شده کلبسیلا پنومونیه تولید و مورد آزمایش قرار گرفت ولی آنها نیز به دلیل اثرات جانبی مضر نتوانسته‌اند اجازه استفاده در بالین

را کسب کنند. نتایج برخی از مطالعات نشان داده است که فاکتورهای بیماری‌زای کلبسیلا پنومونیه مانند پروتئین‌های فیمبریه و یا پروتئین‌های غشای خارجی به خوبی سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند و اثرات جانبی کمتری در مقایسه با واکسن‌های قبلی دارند، بنابراین به عنوان نامزد تولید واکسن معرفی شدند [۹، ۱۰].

ابزارهای بیوانفورماتیک در سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری داشته‌اند و استفاده از آنها در حیطه‌های مختلف پزشکی مانند طراحی دارو، واکسن و یا شبیه‌سازی‌های مختلف مانند اتصال دارو و یا آنتی‌بادی به سلول‌های هدف، نقش بسیار مهمی در کاهش هزینه‌ها داشته است.

پروتئین‌های غشای خارجی X و K36^۱ از پروتئین‌های مهم کلبسیلا پنومونیه می‌باشند و با اتصال به سلول‌های میزبان و همچنین تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در بیماری‌زایی باکتری دارند [۸-۱۰]. باتوجه به شیوع بالای عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه و محدودیت‌های جدی در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌ها، و همچنین عدم وجود واکسن تایید شده جهت استفاده برای پیشگیری از عفونت‌های کلبسیلا پنومونیه، هدف از این مطالعه استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک جهت بررسی اپی‌توپ‌های پروتئین‌های غشای خارجی X و K36 برای طراحی واکسن ضد کلبسیلا پنومونیه است.

روش کار

پروتئین‌های مورد بررسی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زابل با شماره IR.ZBMU.REC.1403.174 به تصویب رسید. توالی کامل پروتئین‌های غشای خارجی X و K36 (OmpX, OmpK36) با شماره دسترسی WP_002895845.1 و WP_322972358.1 از پایگاه

^۱ Outer Membrane Protein X, Outer Membrane Protein K36

جهت اطمینان از صحت نتایج از پارامترهای GMQE^۱ و QMEANDisCo Score^۲ استفاده شد. همچنین کیفیت ساختار سوم پروتئین با استفاده از RAMPAGE (<https://mordred.bioc.cam.ac.uk/>) مورد بررسی قرار گرفت [۲۱]. پس از تهیه ساختار سوم پروتئین‌ها، آنتی‌ژن‌های فضایی با استفاده از سرور Discotope و Ellipro ارزیابی شدند (<http://tools.iedb.org/main/bcell/>).

بررسی سمیت، آلرژن‌سیتی و شباهت به پروتئین‌های انسانی

اپی‌توپ‌های پیش بینی شده از نظر سمیت، شبیه بودن به پروتئین‌های انسانی و همچنین آلرژن‌زا بودن به ترتیب با استفاده از سرورهای Toxinpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred>)

و NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) و AllercatPro (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>) مورد بررسی قرار گرفتند [۲۳، ۲۲].

بررسی ویژگی‌های مولکولی اپی‌توپ‌های نهایی

ویژگی‌های مهم اپی‌توپ مانند پایداری، ضریب آلفاتیک، نیمه عمر و پی‌اچ ایزوالکتریک با استفاده از سرور Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) بررسی شد [۲۴].

بررسی توانایی اتصال اپی‌توپ‌های نهایی به MHC-I و

MHC-II و فعال کردن لنفوسیت‌های T

اتصال به MHC کلاس یک و دو نقش بسیار مهمی در فعال شدن لنفوسیت‌های T و فعال شدن سیستم ایمنی دارد. به همین دلیل توانایی اتصال اپی‌توپ‌های نهایی به MHC کلاس یک و دو با استفاده از سرورهای IEDB (<http://tools.iedb.org>) و SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) و بررسی شد [۲۵]. برای این منظور آلل‌های پرتکرار MHC-I و MHC-II از سرور

اینترنتی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) دانلود شد. در قدم اول برای بررسی نواحی حفاظت‌شده و همچنین بررسی ساختار ثانویه پروتئین، توالی‌های بدست آمده با استفاده از بلاست GOR IV (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) و Protparam به آدرس اینترنتی

<https://npsa-prabi.ibcp.fr>

<https://web.expasy.org/protparam>

مورد بررسی قرار گرفتند [۱۲، ۱۱]. آنتی‌ژن‌سیتی (توانایی به وجود آوردن پادتن) پروتئین‌های مورد نظر با استفاده از نرم افزار VaxiJen به آدرس <https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html> مورد بررسی قرار گرفت [۱۳].

بررسی اپی‌توپ‌های خطی لنفوسیت B

برای ارزیابی اپی‌توپ‌های خطی لنفوسیت‌های B از سرور IEDB به آدرس اینترنتی <http://tools.iedb.org/main/bcell/> استفاده شد. در این سرور اپی‌توپ‌ها بر اساس ویژگی‌هایی مانند قابلیت دسترسی سطحی، انعطاف‌پذیری، چرخش بتا، آبدوستی و توانایی به وجود آوردن پادتن انتخاب می‌شوند [۱۴-۱۸]. برای ویژگی‌های ذکر شده پنجره تنظیمات طول اپی‌توپ بر روی ۷ قرار گرفت و درخصوص بقیه موارد از تنظیمات پیش فرض سرورها استفاده شد. اپی‌توپ‌هایی که حداقل در ۳ ویژگی مثبت بودند برای ادامه مطالعه انتخاب شدند. همچنین از دو سرور ABCpred و EMBOSS به آدرس اینترنتی

<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC>

<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>

برای بررسی بیشتر اپی‌توپ‌ها استفاده شد [۱۹].

بررسی اپی‌توپ‌های غیر خطی (فضایی) لنفوسیت B

برای بررسی اپی‌توپ‌های فضایی پروتئین‌ها، ساختار سوم پروتئین با استفاده از سرور SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) تهیه شد [۲۰].

¹ Global Model Quality Estimate

² Higher Numbers Indicating Higher Expected Quality

(<http://www.alleleffrequencies.net>) دانلود و مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

ویژگی‌های پروتئین مورد بررسی

نتایج Blast نشان داد که پروتئین‌های Ompk36 و OmpX حفاظت‌شده می‌باشند، به طوری که شباهت بیش از ۹۸ درصد در بین سویه‌های مختلف کلبسیلا پنومونیه مشاهده شد. بر اساس آنالیز ProtParam و GOR IV وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک برای Ompk36 و OmpX به ترتیب ۴۰۹۸۸/۵۸ و ۴۰۵۱-۱۸۴۶۳/۴۰ و ۸/۶۷ بود. همچنین ضریب ناپایداری^۱ و آلیفاتیک^۲ به ترتیب ۲۰/۱۷ و ۶۶/۷۶ - ۱۶/۶۴ و ۶۴/۸۸ محاسبه شد. این نتایج نشان دهنده این است که میزان پایداری پروتئین در سلول‌های پستانداران (شرایط آزمایشگاهی) بیش از ۳۰ ساعت، در باکتری *شریشیا کلی* بیش از ۱۰ ساعت و در سلول مخمر بیش از ۲۰ ساعت می‌باشد.

^۱ Instability Index

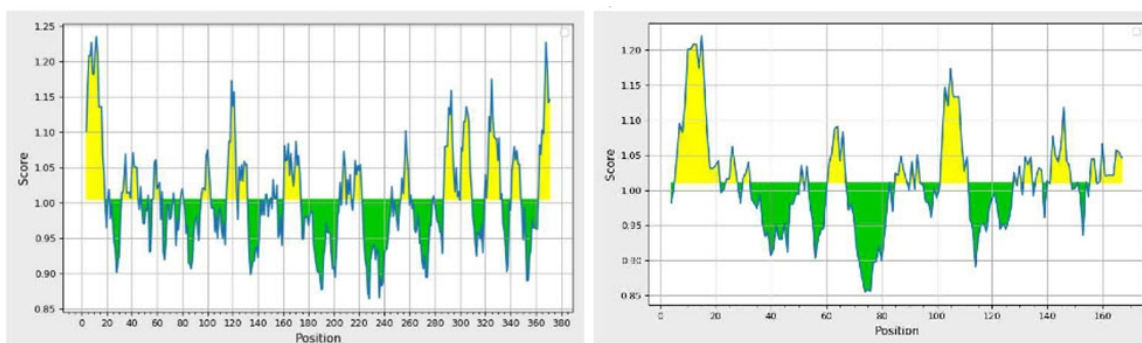
^۲ Aliphatic Index

ساختار دوم پروتئین Ompk36 تشکیل شده است از: ۱۴/۴۴ درصد آلفا هلیکس، ۲۵/۴ درصد Extended strand و ۶۰/۱۶ Random coil. براساس نتایج بدست آمده از نرم افزار VaxiJen (امتیاز ۰/۸۱۲۵)، پروتئین OmpK36 آنتی‌ژن قوی بوده و می‌تواند سیستم ایمنی را تحریک کند. ساختار دوم پروتئین OmpX تشکیل شده است از: ۱۴/۷۱ درصد آلفا هلیکس، ۳۲/۹۴ درصد Extended strand و ۵۲/۳۵ Random coil. براساس نتایج بدست آمده از نرم‌افزار VaxiJen (امتیاز ۰/۶۳۷۴)، پروتئین OmpX آنتی‌ژن قوی بوده و می‌تواند سیستم ایمنی را تحریک کند.

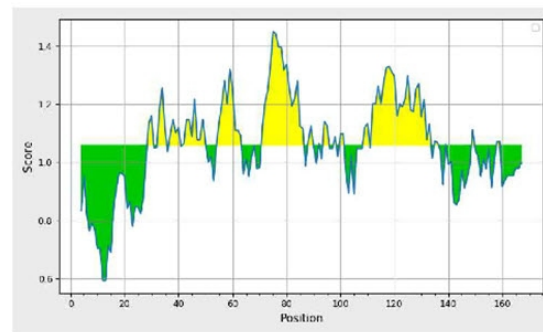
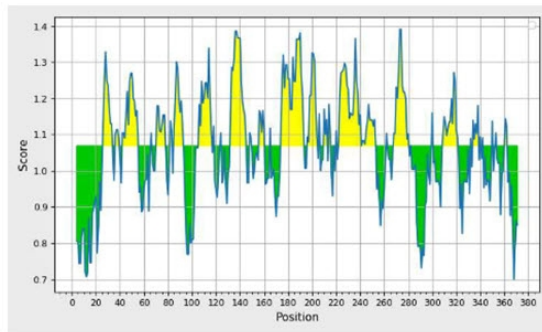
شناسایی اپی‌توپ‌های خطی OmpX و OmpK36

جهت تحریک لنفوسیت‌های B

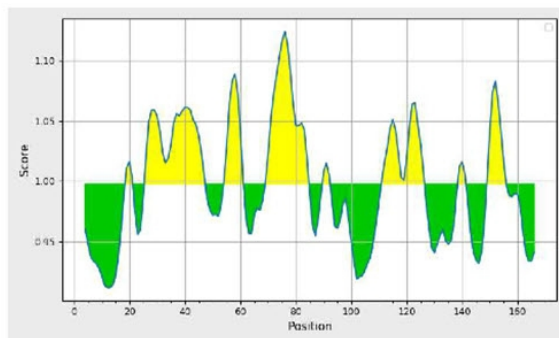
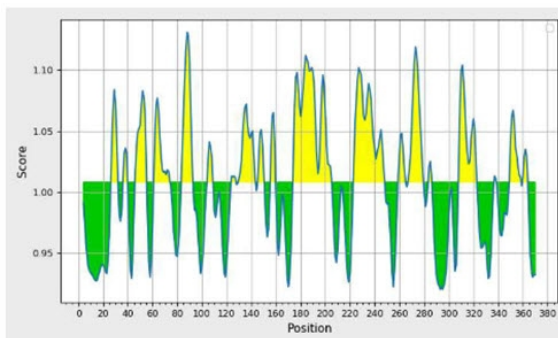
اپی‌توپ‌های خطی لنفوسیت‌های B با استفاده از سرورهای IEDB و ABCpred بررسی شدند. در شکل‌های ۱ تا ۵ نتایج ارزیابی اپی‌توپ‌ها بر اساس ویژگی‌های مختلف نشان داده شده است. در جداول ۱ و ۲ ویژگی‌های اپی‌توپ‌های نهایی انتخاب شده نشان داده شده است. این اپی‌توپ‌ها پس از ارزیابی نتایج سرورهای مختلف انتخاب شدند.



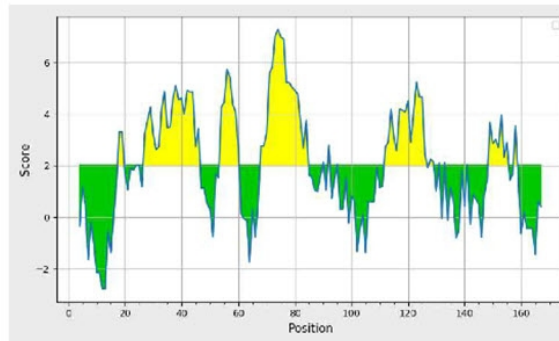
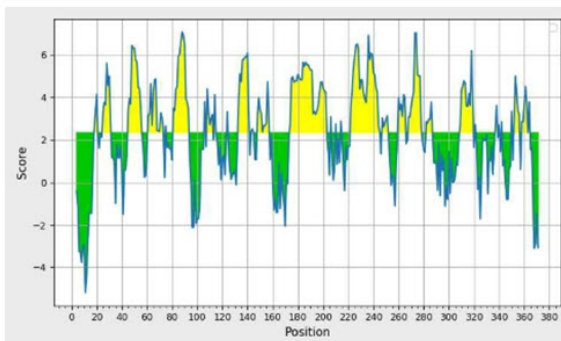
شکل ۱. نمودار بررسی توانایی به وجود آوردن پادتن پروتئین OmpK36 (سمت راست) و OmpX (سمت چپ). نواحی زرد رنگ نشان دهنده اپی‌توپ‌های دارای آنتی‌ژن‌سیته می‌باشند. نواحی سبز رنگ نشان دهنده عدم آنتی‌ژن‌سیته.



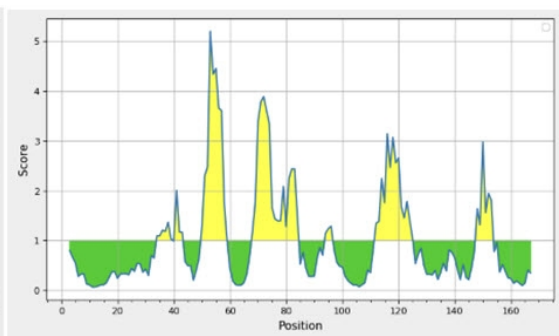
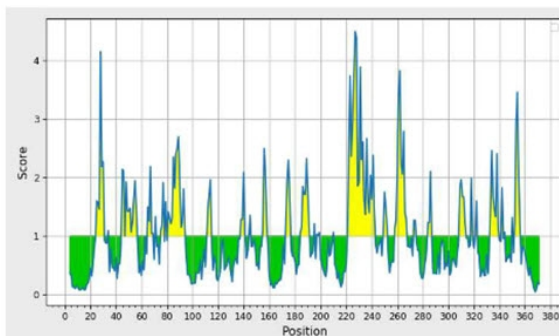
شکل ۲. نمودار بررسی مربوط به نواحی چرخش بتا OmpK36 (سمت راست) و OmpX (سمت چپ). نواحی زرد رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های مناسب می‌باشند. نواحی سبز رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های غیر مناسب.



شکل ۳. نمودار بررسی مربوط به نواحی انعطاف پذیر پروتئین OmpK36 (سمت راست) و OmpX (سمت چپ). نواحی زرد رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های مناسب می‌باشند. نواحی سبز رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های غیر مناسب.



شکل ۴. نمودار بررسی مربوط به نواحی آبدوست پروتئین OmpK36 (سمت راست) و OmpX (سمت چپ). نواحی زرد رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های مناسب می‌باشند. نواحی سبز رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های غیر مناسب.



شکل ۵. نمودار بررسی مربوط به نواحی با قابلیت دسترسی سطحی پروتئین OmpK36 (سمت راست) و OmpX (سمت چپ). نواحی زرد رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های مناسب می‌باشند. نواحی سبز رنگ نشان دهنده اپی-توپ‌های غیر مناسب.

جدول ۱. انتخاب اپی-توپ‌های نهایی بر اساس یافته‌های سرور ABCpred و IEDB

Prediction Tool	توانایی به وجود آوردن	چرخش	انعطاف پذیری	آبدوستی	قابلیت دسترسی	Bepipred1	Bepipred2	ABCpred
Epitope	پادتن	بتا			سطحی			
OmpK36								
44FSDDKSV	+	+	+	+	+	-	+	+
50VDGDQTY	+	+	+	+	+	+	-	+
66QINDQLT	+	-	+	+	+	+	+	+
79YNVQANN	+	+	-	+	+	+	+	+
80NVQANNT	+	+	+	+	+	+	+	+
138TYGSDNF	+	+	+	+	+	+	+	+
171LQYQGKN	+	+	+	+	+	-	+	+
207TYDIYDG	+	+	+	+	+	-	+	+
261TQTYNAT	+	+	+	+	+	+	+	+
264YNATRFS	+	+	+	-	+	+	+	+
275SDSISGF	+	+	+	+	-	+	+	+
277SISGFAN	+	+	+	+	-	+	+	+
311GKDIEGY	+	+	+	+	+	+	+	+
OmpX								
27STVTGGY	+	+	+	+	-	+	-	+
80YNKGQYY	+	+	+	+	+	+	-	+
148SYEQSRI	+	-	+	+	+	-	+	+
110YGKFQNN	-	+	+	+	+	+	+	+
16ASVGTTA	+	-	+	+	-	-	-	+

جدول ۲. نتایج ارزیابی اپی-توپ پروتئین OmpK36 و OmpX توسط سرور EMBOSS

Protein	Predicted Antigenic Region	Maximum Score pos*
OmpK36	4KVLSLLVPALLVAGA	12
	362TDDVVALGLV	368
	320QDLLKYVDVGATYY	325
	115NYGVVYDVT	119
	287NFEVVAQYQFDFGLRPSVAYLQS	293
	253NIYLATQ	257
	161FGLVDGLNFALQYQ	170
	341YVDYKINL	343
	95TRLAFAGL	100
	32LDLYGKIDGLHYFS	41
	56YMRVGVK	59
	216AGFAYSH	217
	125WTDVLPE	129
	5ARLSALAVVLAASVGT	15
	101SIYGVVGVGYG	105
OmpX	140IENVALDFSIEQ	146
	61LGVISF	64
	156NVDVGTWIAQVG	160
	85YYGITAGPAYR	93

*موقعیت بیشترین میزان آنتی‌ژنیسته

شناسایی اپی-توپ‌های غیر خطی (فضایی)

لنفوسیت‌های B

Model Quality Estimate تایید شد. میزان

OmpX برای GMQE و QMEANDisCo

و OmpK36 به ترتیب 0.70 ± 0.07 و 0.64 و 0.82 ± 0.05 و 0.84 محاسبه شد (شکل ۶ و ۷).

همچنین نتایج آنالیز Ramachandran Plots نشان

داد که مدل تهیه شده از کیفیت بالایی برخوردار

برای شناسایی اپی-توپ‌های فضایی ابتدا مدل سه بعدی

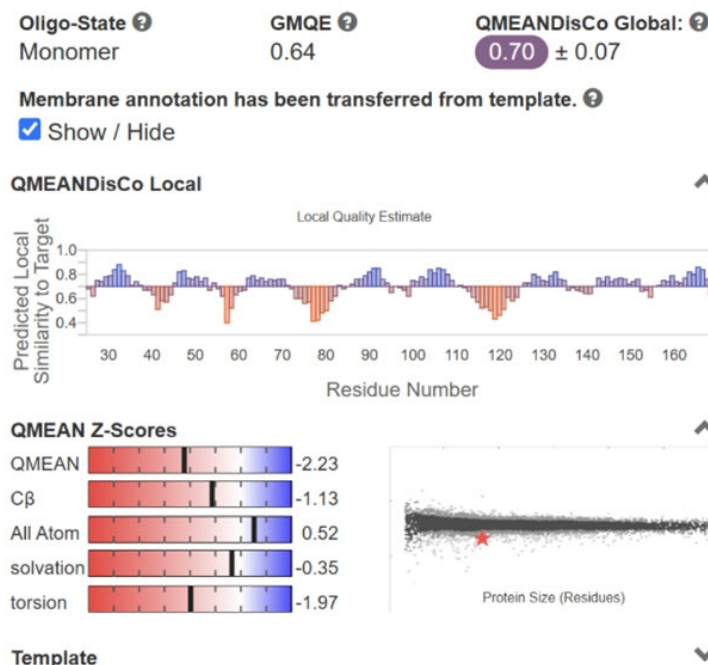
پروتئین‌ها با استفاده از سرور SWISS-MODEL

تهیه شد. صحت مدل تهیه شده با استفاده از

پارامترهای QMEANDisCo و GMQE (Global

Ellipro اپی-توپ‌های غیرخطی ارزیابی شدند. در جدول ۳ نتایج ارزیابی نشان داده شده است.

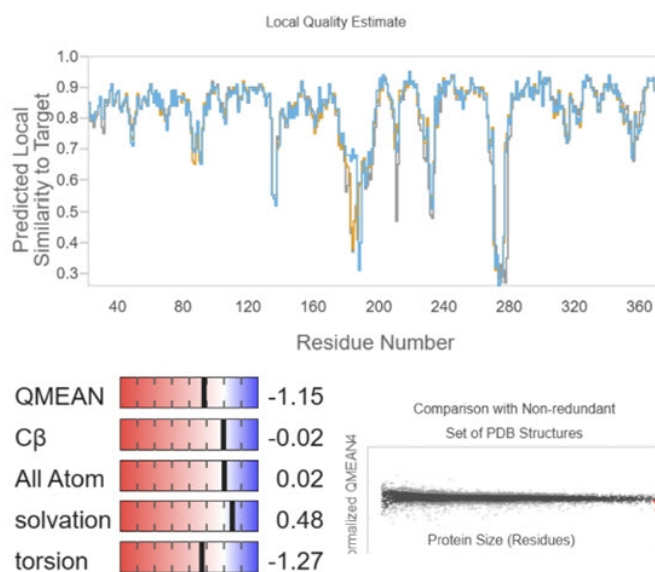
است، به طوریکه ۹۸ درصد اسید آمینه‌های بررسی شده در ناحیه مجاز قرار داشتند. پس از تهیه مدل سه بعدی، با استفاده از نرم افزارهای Discotope و



شکل ۶. نتایج ارزیابی کیفیت و صحت ساختار سوم OmpX تهیه شده توسط سرور SWISS MODEL. نزدیک بودن اعداد Z-score به صفر و همچنین ستاره قرمز به ناحیه تیره نشان دهنده کیفیت بالای مدل می‌باشد.

QMEANDisCo Global: 0.82 ± 0.05

Coordinates with QMEAN local scores in the B-factor column



شکل ۷. نتایج ارزیابی کیفیت و صحت ساختار سوم OmpK36 تهیه شده توسط سرور SWISS MODEL. نزدیک بودن اعداد Z-score به صفر و همچنین ستاره قرمز به ناحیه تیره نشان دهنده کیفیت بالای مدل می‌باشد.

جدول ۳. نتایج ارزیابی اپی‌توپ‌های فضایی پروتئین OmpX و OmpK36

Protein	Prediction Sever	Epitope Number	Selected Epitopes
OmpK36	Discotope 2 Ellipro	10 2	G175, K176, N177, G178, S179, V180, S181, G182 A38, G40, H42, F44, S45, D46, D47, K48, S49, V50 A292, Y294, Q295, F296, F298, G299, L300, P302, V304 N253, I254, L256
OmpX	Discotope 2 Ellipro	5 4	A25, T26, S27, Y54, E55, Q56, D57, N58, N59, P60, L61, G62, P92, Y94, R95, L96, N97, D98, W99 A100, F137, N138, P139, I140, E141, N142, V143, L145, G165, V166, G167, Y168, R169, F170

بررسی سمیت، شباهت به آنتی‌ژن‌های انسانی،**آلرژی‌زا بودن و انتخاب اپی‌توپ نهایی**

نتایج بدست آمده از سرورهای مختلف مورد استفاده (IEDB, ABCpred, EMBOSS, Expasy, Ellipro, Discotope, APP) با یکدیگر مقایسه و پپتیدهای نهایی انتخاب شدند. بر اساس نتایج بلاست شباهت مهمی بین پپتیدهای نهایی و آنتی‌ژن‌های انسانی مشاهده نشد (ضریب بیش از ۹۰ درصد در شباهت و

همپوشانی). همچنین سمیت و آلرژی‌زا بودن اپی-توپ‌های نهایی منفی بود.

ویژگی‌های مولکولی پپتید نهایی

در جدول ۴ ویژگی‌های مولکولی پپتیدهای نهایی نشان داده شده است. براساس ویژگی‌هایی مانند ضریب ناپایداری، آلیفاتیک ایندکس و پی‌اچ ایزوالکتریک، اپی‌توپ‌های انتخاب شده پایدار بوده و دارای نیمه عمر طولانی می‌باشند.

جدول ۴. نتایج ویژگی‌های مولکولی اپی‌توپ‌های نهایی

Epitope OmpK36	Instability index	Aliphatic index	Stability	Half-life	pI
EP1-GKIDGLHYFSDDKSV	21.65	71.33	Stable	>30h mammalian reticulocytes (Invitro) >20h Yeast (In vivo) >10h E. coli (In vivo)	5.3
EP2- VVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDIEGY	60.54	80	Unstable	>100h mammalian reticulocytes (Invitro) >20h Yeast (In vivo) >10h E. coli (In vivo)	6.09
EP3-IYLATQYTQTYNAT	-12.94	70	Stable	>20h mammalian reticulocytes (Invitro) >30min Yeast (In vivo) >10h E. coli (In vivo)	5.53
EP4-GLVDGLNFALQYQGKN	0.94	97.5	Stable	>30h mammalian reticulocytes (Invitro) >20h Yeast (In vivo) >10h E. coli (In vivo)	5.83
OmpX EP1-YNKGQYYGITAGPAYR	12.73	36.88	Stable	2.8h mammalian reticulocytes (Invitro) 10min Yeast (In vivo) 2min E. coli (In vivo)	9.4
EP2-SYEQSRIRNVDVGTWIAGVG	25.37	87.5	Stable	1.5h mammalian reticulocytes (Invitro) >20h Yeast (In vivo) >10h E. coli (In vivo)	5.79
EP3-SIYGVVGVGYGKFQNN	-22.46	78.75	Stable	1.9h mammalian reticulocytes (Invitro) >20h Yeast (In vivo) >10h E. coli (In vivo)	8.22
EP4-ARLSALAVVLAASVGTTA	0.01	146.67	Stable	4.4h mammalian reticulocytes (Invitro) >20h Yeast (In vivo) >10h E. coli (In vivo)	9.79

بررسی اپی‌توپ‌های لنفوسیت T (اتصال به MHC-I و MHC-II)

است. اپی‌توپ‌های نهایی انتخاب شده به لنفوسیت‌های T مختلف متصل می‌شوند. بنابراین می‌توانند موجب فعال شدن آنها شوند.

نتایج مربوط به توانایی اتصال پپتیدهای نهایی به MHC-I و MHC-II در جدول ۵ و ۶ نشان داده شده

جدول ۵. نتایج اتصال اپی‌توپ‌های نهایی پروتئین OmpK36 به لنفوسیت‌های T

Epitope	Predicted by HLA -I (Class I)	Predicted by HLA -II (class II)
GKIDGLHYFSDDKSV (EP1)	HLA-A*02:01, HLA-A*26:01	HLA-DRB1*15:01
VVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDIEGY (EP2)	HLA-A*02:03, HLA-B*44:03	HLA-DRB4*01:01
	HLA-A*02:03, HLA-A*02:06	HLA-DRB1*07:01
	HLA-B*35:01, HLA-A*02:01	HLA-DRB5*01:01
	HLA-A*33:01, HLA-A*03:01	HLA-DRB3*01:01
	HLA-A*30:01, HLA-A*30:02	HLA-DRB3*02:02
	HLA-B*15:01, HLA-A*32:01	HLA-DRB1*15:01
	HLA-A*32:01, HLA-A*11:01	HLA-DRB4*01:01
	HLA-A*01:01, HLA-A*03:01	
	HLA-A*02:06, HLA-B*40:01	
	HLA-B*07:02, HLA-A*31:01	
	HLA-A*68:01, HLA-B*08:01	
	HLA-A*26:01, HLA-B*58:01	
IYLATQYTQTYNAT (EP3)	HLA-B*35:01, HLA-B*15:01	NA**
	HLA-B*53:01, HLA-A*01:01	
	HLA-B*58:01, HLA-A*30:02	
	HLA-A*02:03, HLA-A*23:01	
	HLA-A*30:02, HLA-A*26:01	
	HLA-A*24:02, HLA-A*02:06	
	HLA-B*57:01, HLA-A*02:01	
GLVDGLNFALQYQGKN (EP4)	HLA-A*02:03, HLA-A*01:01	HLA-DRB1*15:01
	HLA-A*02:06, HLA-A*02:01	HLA-DRB1*03:01
	HLA-B*35:01, HLA-A*30:02	HLA-DRB1*04:01
	HLA-B*53:01, HLA-A*03:01	
	HLA-A*26:01	

NA** شناخته نشده

جدول ۶. نتایج اتصال اپی‌توپ‌های نهایی پروتئین OmpX به لنفوسیت‌های T

Epitope	Predicted by HLA -I (Class I)	Predicted by HLA -II (class II)
YNKGQYYGITAGPAYR (EP1)	HLA-B*35:01	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02
	HLA-A*30:02	HLA-DRB1*01:01
	HLA-B*15:01	HLA-DRB1*09:01
	HLA-A*31:01	HLA-DRB1*08:02
	HLA-A*33:01	HLA-DRB5*01:01
	HLA-A*68:01	HLA-DRB1*07:01
	HLA-B*53:01	HLA-DRB1*04:01
	HLA-A*68:01	HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01
	HLA-A*11:01	HLA-DRB3*02:02
		HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01
		HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01
		HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01
		HLA-DRB3*01:01
		HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01
		HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02
		HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01
		HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02
		HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01
SYEQSRIRNVDTGTWIVG (EP2)	HLA-A*32:01	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02
	HLA-B*57:01	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02
	HLA-A*68:02	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01

SIYGVVGVGYGKFQNN (EP3)	HLA-B*58:01	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01 HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01 HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01 HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01 HLA-DRB1*12:01
	HLA-B*44:02	
	HLA-B*44:03	
	HLA-B*40:01	
	HLA-B*58:01	
	HLA-A*26:01	
	HLA-A*26:01	
	HLA-A*11:01	
	HLA-A*30:02	
	HLA-B*15:01	
	HLA-A*03:01	
	HLA-A*68:01	
	HLA-A*23:01	
	HLA-A*24:02	
ARLSALAVVLAASVGTTA (EP4)	HLA-A*02:03	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02 HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01
	HLA-A*32:01	
	HLA-B*51:01	
	HLA-A*02:01	
	HLA-A*02:03	
	HLA-A*02:06	
	HLA-A*02:06	

بحث

در پزشکی، واکسیناسیون همواره نقش مهمی در پیشگیری و کاهش مرگ و میرهای ناشی از بیماری‌های عفونی داشته است و به عنوان یک روش پیشگیری ایمن و مورد اعتماد مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به نقش مهم کلبسیلا پنومونیه در ایجاد عفونت‌های مختلف و همچنین محدودیت‌های جدی که به دلیل گسترش مکانیسم‌های مقاومت در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد، مطالعه حاضر به منظور شناسایی اپی‌توپ‌های تحریک کننده لنفوسیت B و T برای استفاده احتمالی در طراحی واکسن انجام شده است.

تا به امروز واکسن‌های مختلفی بر اساس کپسول پلی ساکاریدی، لیپوپلی ساکارید و یا پروتئین‌های کلبسیلا پنومونیه تولید شده است، ولی هیچکدام از آنها بنا بر دلایلی مانند سمیت، واکنش با سلول‌های خودی و یا حتی تنوع بالا در سروتایپ‌های مختلف مورد استفاده گسترده قرار نگرفته اند [۳۰-۲۶]. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که پروتئین‌های غشای خارجی به خوبی می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک کنند، بنابراین می‌توانند کاندیدهای خوبی برای طراحی واکسن باشند [۳۱].

برای جلوگیری از ایجاد واکنش‌های متقاطع، تولید واکسن براساس اپی‌توپ‌ها می‌تواند راهکار مناسبی باشد. در واقع اپی‌توپ‌ها نواحی از پروتئین هستند که می‌توانند به خوبی سیستم ایمنی را تحریک کنند. با توجه به نقش مهم پروتئین‌های غشای خارجی در بیماری‌زایی کلبسیلا پنومونیه، در این مطالعه از پروتئین‌های غشای خارجی OmpK36 و OmpX استفاده شد. این پروتئین‌ها در اتصال باکتری به سلول میزبان، ایجاد بیوفیل، جذب مواد غذایی و حتی ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارند [۳۲-۳۴].

بر اساس نتایج این مطالعه، همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، در قدم اول ۱۳ اپی‌توپ لنفوسیت B برای OmpK36 و ۵ اپی‌توپ لنفوسیت B برای OmpX شناسایی شد. این اپی‌توپ‌ها در نواحی مختلف پروتئین OmpK36 و OmpX قرار داشتند (شکل ۱ تا ۵). برای اطمینان از صحت نتایج بدست آمده از ابزارهای APP، ABCpred و EMBOSS نیز استفاده شد (جدول ۱ و ۲).

برای طراحی آنتی‌ژن‌های موفق جهت طراحی واکسن، علاوه بر اپی‌توپ‌های خطی، اپی‌توپ‌های فضایی (غیر پیوسته) نیز باید مد نظر قرار بگیرند. به همین منظور در این مطالعه پس از طراحی موفق ساختار سه بعدی پروتئین (شکل ۶ و ۷)، اپی‌توپ‌های فضایی با استفاده از

نرم افزارهای 2 Discotope و Ellipro شناسایی شد و نتایج آن در جدول ۳ نشان داده شده است. برای دستیابی به واکنش موفق علاوه بر لئوسیت‌های B، شرایط لئوسیت‌های T نیز باید مد نظر قرار بگیرد. تحریک شدن لئوسیت‌های T ارتباط مستقیم با اتصال آنتی‌ژن‌ها به MHC کلاس ۱ و ۲ دارد. به همین دلیل در این مطالعه اتصال پپتیدهای شناسایی شده با MHC کلاس ۱ و ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که در جدول ۵ و ۶ نمایش داده شده است پپتیدهای شناسایی شده توانایی اتصال به MHC‌ها را دارند، بنابراین می‌توانند لئوسیت‌های T را تحریک و موجب ایمنی شوند.

پس از شناسایی اپی‌توپ‌های خطی، فضایی و نواحی آنتی‌ژنیک پروتئین‌های OmpK36 و OmpX، در نهایت ۴ پپتید برای پروتئین OmpK36 و ۴ پپتید هم برای پروتئین OmpX شناسایی شد (جدول ۴). پپتیدهای شناسایی شده برای OmpK36 در نواحی مختلف پروتئین مانند ناحیه ۳۶ تا ۵۰، ۲۹۰ تا ۳۱۸، ۲۵۴ تا ۲۶۷ و ۱۶۲ تا ۱۷۷ قرار داشتند. برای پروتئین OmpX این نواحی عبارت بودند از: ۸۰ تا ۹۵، ۱۴۸ تا ۱۶۷، ۱۰۱ تا ۱۱۶ و ۶ تا ۲۳.

پپتید (اپی‌توپ) مناسب برای استفاده در واکسیناسیون باید علاوه بر توانایی تحریک سیستم ایمنی، ویژگی‌های دیگری نیز داشته باشد. به عنوان مثال باید ساختار آن پایدار باشد، نیمه عمر بالایی داشته باشد و همچنین pH ایزوالکتریک آن از pH خنثی خون دور باشد [۳۶، ۳۵]. به همین دلیل پس از شناسایی این اپی‌توپ‌ها ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پپتیدهای شناسایی شده پایدار بوده، نیمه عمر بالایی دارند و همچنین pH ایزوالکتریک آن‌ها از شرایط خون دور می‌باشد (جدول ۴).

قبل از استفاده از پپتیدهای شناسایی شده از عدم سمی بودن و حساسیت‌زایی آن‌ها باید اطمینان حاصل کرد. سمیت و حساسیت‌زایی پپتیدهای

شناسایی شده با استفاده از ابزار Toxinpred و AllercatPro مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی برای سمیت و حساسیت را بودن پپتیدهای شناسایی شده منفی بود.

در مطالعه مشابهی که توسط زرگران و همکاران انجام شده است، پروتئین فیمبریه که به عنوان یکی از فاکتورهای ویروالانس مهم کلبسیلا پنومونیه برای اتصال به سلول میزبان و ایجاد بیماری شناخته می‌شود با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک جهت یافتن اپی‌توپ‌های مناسب مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج مطالعه مذکور ۴ اپی‌توپ در نواحی مختلف پروتئین فیمبریه را به عنوان نامزد طراحی واکنش معرفی کرده است [۳۷].

در مطالعه حسین و همکاران با استفاده از پروتئین‌های غشای خارجی ۱۷ و K36 واکنش نوترکیب تهیه و در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موش ایمنی‌زایی آن بررسی شده است. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که پروتئین غشای خارجی ۱۷ و K36 به خوبی می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک و حفاظت موثر ایجاد کنند [۳۸].

در این مطالعه شناسایی پپتیدهای پیشنهادی براساس ابزارهای بیوانفورماتیک انجام گرفته است، به همین دلیل قبل از تصمیم‌گیری و برای اطمینان از نتایج بدست آمده، مطالعات کامل‌تر مانند طراحی فیوژن پروتئین، مولکولار داکینگ، کشت سلولی و یا بررسی تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها در شرایط آزمایشگاهی ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه چندین ابزار معتبر بیوانفورماتیک برای شناسایی اپی‌توپ‌های مهم پروتئین‌های OmpX و OmpK36 که توانایی تحریک لئوسیت‌های B و T را دارند مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع ۸ پپتید برای استفاده احتمالی در واکسیناسیون شناسایی شد. این پپتیدها ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسبی دارند

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زابل به دلیل حمایت‌های صورت گرفته تشکر و قدردانی می‌کنند.

و می‌توانند لنفوسیت‌های B و T را به خوبی تحریک کنند، ولی قبل از هرگونه تصمیم‌گیری مطالعات بیشتری هم در شرایط In-vitro و هم در شرایط In-vivo باید صورت پذیرد.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچگونه تضاد منافع در این مطالعه ندارند.

References

- 1-Li Y, Kumar S, Zhang L. Mechanisms of antibiotic resistance and developments in therapeutic strategies to combat *Klebsiella pneumoniae* infection. Infect Drug Resist. 2024; 17: 1107-19.
- 2-Han X, Yao J, He J, Liu H, Jiang Y, Zhao D, et al. Clinical and laboratory insights into the threat of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents. 2024; 64 (3):107275.
- 3-Beig M, Aghamohammad S, Majidzadeh N, Asforooshani MK, Rezaie N, Abed S, et al. Antibiotic resistance rates in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains: a systematic review and meta-analysis. J Glob Antimicrob Resist. 2024; 38: 376-88.
- 4-Tang Y, Du P, Du C, Yang P, Shen N, Russo TA, et al. Genomically defined hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* contributed to early-onset increased mortality. Nat Commun. 2025; 16(1): 2096.
- 5-Liao Y, Gong J, Yuan X, Wang X, Huang Y, Chen X. Virulence factors and carbapenem-resistance mechanisms in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Infect Drug Resist. 2024; 17: 1551-9.
- 6-Vaez H, Yazdanpour Z. Distribution of virulence-associated and aminoglycoside resistance genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the southeast of Iran, during 2019–2023: a cross-sectional study. Health Sci Rep. 2024; 7(12): e70309.
- 7-Dangor Z, Benson N, Berkley JA, Bielicki J, Bijlma MW, Broad J, et al. Vaccine value profile for *Klebsiella pneumoniae*. Vaccine. 2024; 42(19): S125-41.
- 8-Lin TL, Yang FL, Ren CT, Pan YJ, Liao KS, Tu IF, et al. Development of *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide-conjugated vaccine candidates using phage depolymerases. Front Immunol. 2022; 13: 843183.
- 9-Vaez H, Vaez V. Comprehensive analysis of four major surface proteins for vaccine design against *Klebsiella pneumoniae*. Infect Epidemiol Microb. 2025; 11(1): 1-12
- 10-Douradinha B. Exploring the journey: A comprehensive review of vaccine development against *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Res. 2024:127837.
- 11-Garnier J. GOR secondary structure prediction method version IV. Meth Enzym RF Doolittle Ed. 1998; 266: 540-53.
- 12-Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud SE, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, editor. The Proteomics Protocol Handbook. Totowa, NJ: Humana press; 2005.
- 13-Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens, and subunit vaccines. BMC Bioinfo. 2007; 8: 1-7.
- 14-Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immune Res. 2006; 2: 1-7.
- 15-Chou PY, Fasman GD. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1979; 47: 45-148.
- 16-Karplus PA, Schulz GE. Prediction of chain flexibility in proteins: A tool for the selection of peptide antigens. Naturwissenschaften. 1985; 72(4): 212-3.

- 17-Emini EA, Hughes JV, Perlow D, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985; 55(3): 836-9.
- 18-Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. 1990; 276(12): 172-4.
- 19-Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous comprehensive review of vaccine development B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins Struct Funct Bioinf*. 2006; 65(1): 40-8.
- 20-Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISSMODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: 296-303.
- 21- Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Prot Sci*. 2018; 27(1): 293315.
- 22-Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PloS One*. 2013; 8(9): e73957.
- 23-Nguyen MN, Krutz NL, Limviphuvadh V, Lopata AL, Gerberick GF, Maurer-Stroh S. AllerCatPro2.0: A web server for predicting protein allergenicity potential. *Nucleic Acids Res*. 2022; 50: 36-43.
- 24-Walker JM. The proteomics protocols handbook. Humana press. Springer; 2005.
- 25-Yan Z, Kim K, Kim H, Ha B, Gambiez A, Bennett J, et al. Next-generation IEDB tools: a platform for epitope prediction and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2024; 52: 526-32.
- 26-Miller JC, Cross AS, Tennant SM, Baliban SM. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide as a vaccine target and the role of antibodies in protection from disease. *Vaccine*. 2024 ;12(10): 1177.
- 27-Chen Z, Gou Q, Yuan Y, Zhang X, Zhao Z, Liao J, et al. Vaccination with a trivalent *Klebsiella pneumoniae* vaccine confers protection in a murine model of pneumonia. *Vaccine*. 2024; 42(23): 126217.
- 28-Shamanna V, Srinivas S, Couto N, Nagaraj G, Sajankila SP, Krishnappa HG, et al. Geographical distribution, disease association and diversity of *Klebsiella pneumoniae* K/L and O antigens in India: roadmap for vaccine development. *Microb Genom*. 2024; 10(7): 001271.
- 29-Li M, Yu M, Yuan Y, Li D, Ye D, Zhao M, et al. Designing a conjugate vaccine targeting *Klebsiella pneumoniae* ST258 and ST11. *Heliyon*. 2024; 10(5): 27417.
- 30-Hakimian M, Doosti A, Sharifzadeh A. A novel chimeric vaccine containing multiple epitopes for simulating robust immune activation against *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Immunol*. 2024; 25(1): 27.
- 31-Tajuelo A, Gato E, Oteo-Iglesias J, Pérez-Vázquez M, McConnell MJ, Martín-Galiano AJ, et al. Deep intra clonal analysis for the development of vaccines against drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* lineages. *Int J Mole Sci*. 2024; 25(18): 9837.
- 32-Illenseher MS, Hentschker C, Gesell Salazar M, Busch LM, Zierke L, Reder A, et al. Global quantitative proteome analysis of a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. *Front Microbiol*. 2025; 16: 1528869.
- 33-Meekes LM, Heikema AP, Tompa M, Astorga Alsina AL, Hiltemann SD, Stubbs AP, et al. Proteogenomic analysis demonstrates increased bla OXA-48 copy numbers and OmpK36 loss as contributors to carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2025; 69 (7): e00107-25.
- 34-Ranjbar KJ, Sarkoobi P, Shahbazi B, Babaei M, Ahmadi K. Bioinformatics analysis of the in silico engineered protein vaccine with and without Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvant on the model of *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*. 2025; 15(1): 7321.
- 35-Novak P, Havlíček V. Protein extraction and precipitation. proteomic profiling and analytical chemistry: The crossroads. Elsevier; 2016.
- 36-Habib A, Liang Y, Xu X, Zhu N, Xie J. Immunoinformatic identification of multiple epitopes of gp120 protein of HIV-1 to enhance the immune response against HIV-1 infection. *Int J Mole Sci*. 2024; 25(4): 2432.
- 37-Zargarán FN, Akya A, Rezaeian S, Ghadiri K, Lorestani RC, Madanchi H, et al. B cell epitopes of four fimbriae antigens of *Klebsiella pneumoniae*: a comprehensive in silico study for vaccine development. *Int J Pept Res Ther*. 2021; 27(2): 875-86.

8-Hussein KE, Bahey-El-Din M, Sheweita SA. Immunization with the outer membrane proteins OmpK17 and OmpK36 elicits protection against *Klebsiella pneumoniae* in the murine infection model. Microb Pathog. 2018; 119: 12-8.