



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“ESTUDIO DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA
RESISTENCIA EN CEPAS DE *Acinetobacter* spp.
CIRCULANTES EN ÁREAS HOSPITALARIAS Y PACIENTES
AMBULATORIOS”**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

M.C. MARÍA ELENA BELLO LÓPEZ

DIRECTORAS DE TESIS:

D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE., MÉXICO

NOVIEMBRE, 2019



BUAP

Puebla, Pue. a 8 de noviembre 2019.

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

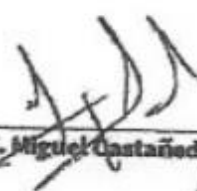
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la alumna María Elena Bello López, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


"Estudio de las bases genéticas de la resistencia en cepas de *Acinetobacter* spp circulantes en áreas hospitalarias y pacientes ambulatorios"

A nuestro juicio, la alumna María Elena Bello López puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.


Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Miguel Castañeda Lucio


D.C. Yolanda Sáenz Domínguez


D.C. Carmen Torres Manrique


D.C. María Lilia Cedillo Ramírez


D.C. Margarita María de la Paz Arenas
Hernández

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC13,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (722) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** del **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas**, Posgrado en Microbiología de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, bajo la dirección de la **D.C. Patricia Lozano Zarain** y la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por otorgar la beca doctoral con el número de becario 273320.

Este trabajo recibió fondos de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, mediante la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)**: proyectos LOZP-NAT17-I y VIEP/2497/16

Asimismo, se reconoce el apoyo brindando para financiar la asistencia a congresos y cursos de la **Coordinación del Posgrado en Microbiología**, de la **Dirección del Instituto de Ciencias (ICUAP)**, así como de la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Al **Hospital para el Niño Poblano** y a la **M.C. Zita Gutiérrez Cázares** por la gestión y donación de las cepas que se usaron en este trabajo (Convenio HNP/ENS/177/2016)

Al **Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla** quien a través de la **Q.F.B. Guadalupe Jiménez Flores** y el **M.C.M.I. José Luis Gálvez Romero** facilitaron las cepas para llevar a cabo este trabajo de investigación y por todo el apoyo recibido (Proyecto No. 188.2018).

Al **Programa de Genómica Evolutiva** del **Centro de Ciencias Genómicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Cuernavaca**, por su colaboración para llevar a cabo las estancias de investigación.

Al **Dr. Luis Lozano Aguirre Beltrán** y la **Ing. María Gabriela Guerrero Ruiz** integrantes de la **Unidad de Análisis Bioinformáticos** del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM por su asesoría y la impartición de los talleres de manejo de datos de secuenciación masiva. También a la **Unidad de Administración de Tecnologías de Información** del mismo centro, por la optimización de nuestro servidor.

Reconocimiento especial al **Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos**, del Programa de Genómica Evolutiva de Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, por la aceptación para realizar las estancias en su laboratorio, por facilitar los recursos necesarios para los experimentos y por la valiosa donación de cepas control y vectores de clonación al LMHyC.

Y al **Dr. Jesús Silva Sánchez**, del Departamento de Resistencia Bacteriana, del Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México, por la donación de cepas que se usaron como controles en esta tesis.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

“Sí he logrado ver más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, muchas gracias por su esfuerzo y dedicación para dirigir este nuevo proyecto con *Acinetobacter*, por la confianza que siempre ha depositado en mí, y por todo el apoyo, consejos y consuelo que me ha brindado en las buenas y en las malas, muchas gracias doctora por siempre alentarme a seguir adelante; espero haber contribuido como usted lo esperaba y haber dejado una semillita para continuar estudiando a las bacterias raras e interesantes con las que nos hemos topado.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, porque junto con la Doctora Pati, ha sido fundamental para lograr esta meta, por su confianza, motivación y consejos en todo momento y por haber compartido experiencias inolvidables durante mi estancia en el laboratorio. ¡Mil gracias por todo a las dos!

Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio** por ser mi guía en las cuestiones moleculares, por su experiencia, anécdotas, discusiones académicas y por compartir su laboratorio con nosotros. Mi reconocimiento a su grupo de trabajo, en especial a la **D.C. Liliana López Pliego** por tu amistad, por la excelente asesoría en los ensayos de hibridación y por la disposición que tuviste para resolver mis inquietudes.

A la **Dra. Carmen Torres Manrique**, por su disposición, por compartir su experiencia conmigo, por su sencillez como profesionista y como persona. Gracias doctora porque la estancia que realicé hace algunos años en su laboratorio marcó un antes y un después en mi formación, y me permitió tener un panorama más amplio sobre la resistencia a los antibióticos.

A la **Dra. Yolanda Sáenz Domínguez**, gracias Yoly por la motivación que siempre me das, por los consejos tan útiles para abordar los mecanismos de resistencia de mis cepas y por la disposición que siempre tienes para resolver mis dudas. Sabes, al igual que “nuestras queridas *Pseudomonas*”, los *Acinetobacter* se han vuelto una de mis bacterias favoritas.

A la **D.C. Margarita María de la Paz Arenas** por su asesoría para realizar la extracción de plásmidos, por sus comentarios y sugerencias que permitieron enriquecer la tesis.

A la **D. C. Lilia Cedillo Ramirez**, por dedicar su tiempo a la revisión de mi tesis y aportar valiosas sugerencias.

Al **D.C. Eduardo Brambila Colombres**, por la disposición y todo el apoyo que nos brindó para la revisión y traducción de los artículos. Gracias también a su familia por compartir con nosotros el tiempo de la Dra. Pati.

Al **Dr. Miguel Ángel Cevallos**, Dr. Mac, usted fue parte importante de este proyecto, porque nos adentró al mundo de la secuenciación masiva y bioinformática, además de compartirnos su vasta experiencia sobre plásmidos. Le agradezco su confianza, el estar al pendiente de mis avances y dificultades. Por su disposición para enseñarme y ayudarme según lo fuera requiriendo la investigación, no sólo a mí, sino también a mis compañeros del laboratorio. Por su calidez, sencillez y además por todas las atenciones que su esposa y usted tuvieron conmigo. Gracias a su grupo de trabajo, todos fueron muy amables. ¡Espero que sea una de varias colaboraciones, muchas gracias por todo!

A la **Dra. Semiramis Castro Jaimes**, te agradezco mucho la paciencia y disposición para compartirme tus conocimientos sobre bioinformática, por las sugerencias para empezar a estudiar a mis cepas, por el empeño que pusiste para analizar los genomas y para completar el plásmido. Tu ayuda fue muy valiosa para llevar a cabo este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

“Sí yo pudiera enumerar cuanto debo a mis grandes antecesores y contemporáneos, no me quedaría mucho en propiedad.”

Johann Wolfgang von Goethe

A mis padres: **María Elena y Juan**, esta tesis se la dedico a ustedes porque son los pilares de mi vida, por su amor y apoyo incondicional, lo quiero mucho.

A mis hermanos: **Isabel, Martha y Juan** por su cariño, por consentirme y apoyarme siempre, gracias también a **Lupita, Rubén y Gustavo** porque son parte fundamental de mi familia.

A mis sobrinos: **Karen, Rubén, Nohemí, Angélica, Diana, Juanito y Alexis** por llenar mi vida.

A mi Abue **Belén**, por todo el amor que nos dio.

¡Infinitas gracias, porque cada logro que consigo también es de ustedes!

A mis amigos: **Gerardo, Dulce, Tatiana, Lucio, Leti, Justo, Lupita, Sagrario, Jesús Emilio, Abraham, Ángel** y a sus familias porque siempre es importante saber que se cuenta con personas tan valiosas como ustedes; a mis “compas” **Lilia, Marycruz, Arturo, Ángeles y Tania** por su amistad sincera y fuera de serie.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad: **Enrique, Jessi, Flor, Cristi, Alex, Eder, Olinca, Yesenia, Claudia, Aime, Edwin, Andrea, Deysi, Marco, Emilio, Miranda, Midory, Mariela, Angélica, Carlos y Cesar** por su ayuda en el labo, por haber sido excelentes compañeros durante todos estos años y porque de cada uno me llevo un aprendizaje; gracias a la niña **Michelle** y a **Pato** por el gran equipo que formamos para estudiar a nuestros Acinetos.

A mis compañeros del **Laboratorio 229 de la Universidad de La Rioja**, a **Hussein Chalhoub** de la **Universidad Católica de Lovaina** y a los integrantes del “**Klebsiella Project**” del **Instituto Sanger**, porque a pesar de la distancia seguimos compartiendo éxitos personales y profesionales, experiencias, consejos y conocimiento.

A mis compañeros del H. R. I.S.S.S.T.E. Puebla: **Leti, Karla, Magali, Alicia, Eliud, Q. Lupita Jiménez, Q. Carlos y Q. Romano**, por su amistad, por impulsarme a superarme y lograr mis objetivos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud y agentes causales	1
1.2 Características del género <i>Acinetobacter</i> y su importancia clínica	2
1.3 Taxonomía de <i>Acinetobacter</i>	3
1.4 Identificación fenotípica y genotípica	4
1.5 Tratamiento, prevención y control de infecciones causadas por <i>Acinetobacter</i>	5
1.6 Mecanismos de resistencia a los antibióticos	6
1.6.1 Inactivación o alteración del antibiótico	6
1.6.2 Modificación del sitio blanco	8
1.6.3 Bombas de expulsión	8
1.6.4 Cambios de permeabilidad de la membrana	9
1.7 Elementos genéticos móviles e islas genómicas de resistencia	9
2. ANTECEDENTES	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVO GENERAL	15
4.1 Objetivo particular 1	15
4.1.1 Objetivos específicos	15
4.2 Objetivo particular 2	15
4.2.1 Objetivos específicos	15
4.3 Objetivo particular 3	16
4.3.1 Objetivos específicos	16
4.4 Objetivo particular 4	16
5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Cepas de estudio	18
6.1.1 Declaración ética	19
6.1.2. Cepas control y cepas receptoras para conjugación y transformación	19
6.2. Métodos de sensibilidad a antibióticos	20
6.2.1 Perfil de resistencia por el método de Kirby-Bauer	20
6.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria por el método de Dilución en Agar (CMI)	22
6.2.3 Concentración Mínima Inhibitoria en presencia y ausencia de inhibidor de bombas de expulsión PA β N (L- fenilalanina-arginina- β -naftilamida)	22
6.2.4 Prueba de detección de Metallo-betalactamasas para <i>Acinetobacter</i>	23
6.3 Tipificación molecular por <i>rpoB</i>	23
6.4 Relación clonal por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (<i>PFGE</i>)	24
6.5 Extracción de ADN por el método de lisis por calor	26
6.6 Cuantificación de ADN	26
6.7 Amplificación de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
6.8 Visualización de productos de PCR	27
6.9 Secuenciación de los productos de PCR	28
6.10 Análisis de las secuencias de productos de PCR	28
6.11 Extracción de plásmidos por el método QuickPrep	29

6.12 Detección por Southern blot de <i>bla</i> _{NDM-1} en los plásmidos de la cepa <i>A. haemolyticus</i> AN54	30
6.13 Ensayos de transferencia de material genético	34
6.14 Mapeo del transposón Tn125-like en la cepa de <i>A. haemolyticus</i> AN54	35
6.15 Secuenciación Masiva de Genomas	37
6.16 Cerrado de la secuencia del plásmido pAhaeAN54	39
6.17 Clonación de fragmentos del plásmido pAhaeAN54	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Hospital para el Niño Poblano (HNP)	41
7.1.1 Procedencia de las cepas	41
7.1.2 Fenotipo de resistencia de las cepas <i>Acinetobacter</i> spp. del HNP	42
7.1.3 Tipificación molecular por <i>rpoB</i> de las cepas aisladas del HNP	43
7.2 Estudio de la resistencia en las diversas especies de <i>Acinetobacter</i>	44
7.2.1 Fenotipo de resistencia de las cepas de <i>A. haemolyticus</i>	45
7.2.2 Fenotipo de resistencia de las cepas del complejo <i>A. calcoaceticus-baumannii</i>	46
7.2.3 Fenotipo de resistencia de las cepas de las diferentes especies de <i>Acinetobacter</i> encontradas	47
7.3 Relación clonal de las cepas de <i>Acinetobacter</i>	48
7.3.1 Relación clonal de las cepas de <i>A. haemolyticus</i>	48
7.3.2 Relación clonal de las cepas <i>A. baumannii</i> -resistentes a carbapenémicos.	49
7.4 Genotipo de resistencia de cepas de <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	50
7.4.1 Genotipo de resistencia a betalactámicos de las cepas de <i>A. haemolyticus</i>	50
7.4.2 Genotipo de resistencia a aminoglucósidos de las cepas <i>A. haemolyticus</i>	54
7.4.3 Genotipo de resistencia a quinolonas de las cepas de <i>A. haemolyticus</i>	56
7.5 Genotipo de resistencia de cepas de <i>A. baumannii</i>	57
7.5.1 Genotipo de resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos de las cepas <i>A. baumannii</i>	57
7.6 Participación de bombas de expulsión en la resistencia a cefotaxima, meropenem, amikacina y ciprofloxacino en las cepas de <i>A. haemolyticus</i> y <i>A. baumannii</i>	57
7.7 Perfil plasmídico de las cepas <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos	58
7.8 Secuenciación masiva del genoma de la cepa <i>A. haemolyticus</i> AN54 portadora de <i>bla</i> _{NDM-1}	62
7.8.1 Caracterización del plásmido pAhaeAN54e portador de <i>bla</i> _{NDM-1}	69
7.8.2 Análisis de la porina CarO de la cepa AN54	74
7.9 Secuenciación masiva del genoma de la cepa <i>A. baumannii</i> AN71	75
7.9.1 Tipificación multilocus y relación clonal	75
7.9.2 Análisis del resistoma y elementos genéticos movilizables asociados con la resistencia a antibióticos en la cepa <i>A. baumannii</i> AN71	76
7.9.3 Porina CarO de la cepa AN71	78
7.9.4 Estudio del plásmido portador de <i>bla</i> _{OXA-72}	79
7.10 Cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla	82
7.10.1 Tipificación molecular por <i>rpoB</i> de las cepas del H.R. I.S.S.S.T.E. Puebla	83
7.10.2 Fenotipo y genotipo de resistencia de las cepas aisladas del H.R. I.S.S.S.T.E. Puebla	84
8. DISCUSIÓN	87
9. CONCLUSIONES	97
10. PERSPECTIVAS	98
BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXOS	112

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Cepas control	20
2	Características de las cepas receptoras para conjugación y transformación	20
3	Puntos de corte del CLSI, 2018 para <i>Acinetobacter</i> spp.	21
4	Puntos de corte de CMI para <i>Acinetobacter</i> spp.	22
5	Oligonucleótidos usados para la tipificación molecular de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp.	24
6	Componentes para la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific)	27
7	Oligonucleotidos para mapeo del transposon Tn125	36
8	Oligonucleotidos para cerrar secuencia de pAhaeAN54	39
9	Oligonucleotidos para clonar fragmentos del plásmido pAhaeAN54e	40
10	Características de los 24 aislados de <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	60
11	Características de las cepas <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes a carbapenémicos	61
12	Datos de las cepas <i>A. haemolyticus</i> resistentes a carbapenémicos	62
13	Moléculas obtenidas por secuenciación masiva de la cepa AN54	66
14	Datos generales y genotipo de resistencia obtenidos por secuenciación masiva de la cepa AN71	77
15	Datos de las cepas de <i>Acinetobacter</i> spp aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla	86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Montaje de transferencia <i>Southern blot</i>	31
2	Localización de oligonucleotidos en el transposon Tn125 del plásmido de referencia pNDM-1-BJ01 de <i>A. lwoffii</i>	36
3	Dendograma que representa la relación filogenética de las 60 cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. tipificadas del HNP, derivado de la secuencia parcial del gen <i>rpoB</i>	44
4	Dendograma obtenido por <i>PFGE</i> de las 20 cepas de <i>A. haemolyticus</i>	49
5	Dendograma obtenido por <i>PFGE</i> de las 5 cepas <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad Pediátrica de Quemados	50
6	Dendograma que representa las diferencias entre las variantes de la familia OXA-214 en las cepas de <i>A. haemolyticus</i>	51
7	Modelo <i>in-silico</i> de las proteínas OXA-575 (paja) y OXA-214 (azul)	52
8	Entorno genético de las betalactamasas OXA-214-like en <i>A. haemolyticus</i>	53
9	Representación de alteraciones en las betalactamasas OXA-214-like	53
10	Dendograma que representa las diferencias entre las variantes TEM-229, TEM-116, TEM-1 y TEM-171	54
11	Dendograma que muestra variantes alélicas de la familia AAC(6')-I (aminoglucósidos 6'-N-acetiltransferasas)	55
12	Extracción de plásmidos por QuickPrep de las cepas <i>A. baumannii</i> resistentes a carbapenémicos	59
13	Prueba fenotípica para detección de metalo- β -lactamasas	63

14	Perfil plasmídico de las cepas AN54 y AN57 obtenido por el método QuickPrep	64
15	A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas línea 1: <i>E. coli</i> NCTC90152, línea 2. Cepa AN54. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda <i>bla</i> _{NDM-1}	65
16	Representación de los plásmidos pAhaeAN54a, pAhaeAN54c y pAhaeAN54d de la cepa AN54 que no portan genes de resistencia a antibióticos	68
17	Representación del plásmido pAhaeAN54e	69
18	Representación esquemática y alineamiento del plásmido pAhaeAN54e de <i>Acinetobacter haemolyticus</i> y los plásmidos pNDM-BJ02 y pNDM-BJ01 de <i>Acinetobacter lwoffii</i>	71
19	Comparación entre el plásmido pAhaeAN54e y los plásmidos parcialmente secuenciados pABC7926 y pNDM69122 de <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	72
20	Comparación entre los plásmidos pAhaeAN54e de <i>Acinetobacter haemolyticus</i> y p06-1619-NDM de <i>Providencia rettgeri</i> , ambos aislados en México	73
21	Modelo <i>in silico</i> de la proteína CarO de la cepa AN54 portadora de <i>bla</i> _{NDM-1}	74
22	Dendograma obtenido de las cepas <i>A. baumannii</i> resistentes de la Unidad Pediátrica de Quemados y la obtenida del servicio de Cirugía	76
23	Representación parcial del contig_21	77
24	Representación del integron In439 que porta la cepa AN71	78
25	Modelaje <i>in silico</i> de la porina CarO de la cepa AN71	78
26	Dendograma que representa las diferencias entre los alelos de las porinas CarO1, CarO2, CarO3 y ATCC17978 de <i>A. baumannii</i> con las cepas AN71 (<i>A. baumannii</i>) y AN54 (<i>A. haemolyticus</i>)	79
27	Comparación de la secuencia del plásmido pAbaAN71 y los plásmidos pAba9201a, pAba10042a y pAba5845a que portan <i>bla</i> _{OXA-72}	81
28	Dendograma que representa la relación filogenética de las 11 cepas tipificadas del H.R. I.S.S.S.T.E. Puebla, derivado de la secuencia parcial del gen <i>rpoB</i> ≈350pb	83

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO	TÍTULO	PÁGINA
1	Porcentaje de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. por origen de la muestra, n=67	41
2	Porcentaje de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. por servicio hospitalario, n=67	42
3	Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las 67 cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. aisladas del Hospital para el Niño Poblano	43
4	Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las 30 de <i>Acinetobacter haemolyticus</i> aisladas del Hospital para el Niño Poblano	45
5	Perfil de sensibilidad por Concentración Mínima Inhibitoria de los 30 de <i>Acinetobacter haemolyticus</i> aislados del Hospital para el Niño Poblano	46
6	Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las cepas de 23 del complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> aisladas del Hospital para el Niño Poblano	47
7	Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las 7 cepas de las otras especies de <i>Acinetobacter</i> del Hospital para el Niño Poblano	48
8	Porcentaje de genes de resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos encontrados en 24 cepas de <i>A. haemolyticus</i>	51
9	Porcentaje de cepas por origen de aislamiento del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, n=15	82
10	Porcentaje de cepas por servicio de aislamiento del Hospital Regional I.S.S.S.T.E Puebla, n=15	82
11	Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las cepas de <i>Acinetobacter</i> spp aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, n=15	84
12	Número de cepas portadoras de genes que codifican para betalactamasas clase D, n=15	85

ABREVIATURAS

Acb	Complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
AN	Amikacina
BET	Bromuro de Etidio
BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
FEP	Cefepime
GN	Gentamicina
H. R. I.S.S.S.T.E.	Hospital Regional del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
HNP	Hospital para el Niño Poblano
IPM	Imipenem
LVX	Levofloxacino
MEM	Meropenem
MIO	Medio para evaluar Movilidad-indol-ornitina
mL	Mililitro
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (<i>Multilocus sequence typing</i>)
mM	Milimolar
NET	Netilmicina
NOR	Norfloxacina
O/F	Prueba de oxidación-fermentación
PAβN	L-Fenilalanina-Arginina-β-Naftilamida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>)
PIP	Piperacilina
r.p.m	Revoluciones por minuto
ST	Secuencia tipo
SXT	Trimetoprim/Sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TIC	Ticarcilina
TIM	Ticarcilina/Ácido clavulánico
TSI	Agar hierro y triple azúcar
TZP	Piperacilina/Tazobactam
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
Mg	Microgramo
μL	Microlitro

RESUMEN

Introducción: El género *Acinetobacter* es un grupo heterogéneo de bacterias de origen ambiental que se asocian a infecciones hospitalarias y de la comunidad, específicamente las del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb), de las cuales *A. baumannii* es el más estudiado; sin embargo, otras especies no-*baumannii*, han cobrado importancia médica y epidemiológica. Son microorganismos que presentan resistencia a antibióticos debida a mecanismos intrínsecos y adquiridos, con escasas opciones de tratamiento que elevan la morbimortalidad de los pacientes.

Objetivo: Estudiar la diversidad clonal y los mecanismos de resistencia en aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. de Hospitales Poblanos.

Material y Métodos: Se recolectaron cepas de pacientes hospitalizados y ambulatorios durante el periodo 2009-2018. Se tipificaron por Vitek2 y secuenciación parcial del gen *rpoB*. Se realizaron pruebas de sensibilidad antibiótica por Kirby-Bauer y concentración mínima inhibitoria en presencia y ausencia del inhibidor de bombas de expulsión. Se determinó la relación clonal por electroforesis en campos pulsados (PFGE) y secuencia tipo. Se determinaron genes de resistencia por PCR y secuenciación. Se secuenció el genoma de dos cepas portadoras de carbapenemasas y se identificaron genes implicados en la resistencia a antibióticos. Se realizó la extracción y caracterización de plásmidos. Se detectó *bla*_{NDM-1} por *Southern blot*, y se realizaron ensayos de conjugación y transformación.

Resultados: Se trabajaron 67 cepas del Hospital para el Niño Poblano (HNP), de las cuales el 66% fueron de líquidos de diálisis y el 16% de heridas, de pacientes internados en medicina interna y urgencias principalmente. Las especies tipificadas fueron: 30 *A. haemolyticus*, 23 del complejo Acb y una cepa de cada una de las siguientes especies: *A. oleivorans*, *A. venetianus*, *A. grimontii*, *A. indicus*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. ursingii*. Las 30 cepas *A. haemolyticus* no presentaron relación clonal y portaron betalactamasas de la familia OXA-214-like, las nuevas variantes OXA-575 (13%), TEM-229 (75%) y tres nuevas enzimas modificadoras de aminoglucósidos: 4% AAC(6')-Iga, 13% AAC(6')-Igb y 42% AAC(6')-Igc. Se evidenció el polimorfismo de la porina CarO entre las especies. Se demostró por primera vez en *A. haemolyticus* la participación de bombas de expulsión en la resistencia a los antibióticos. En la cepa AN54 se caracterizó el plásmido pAhaeAN54e que porta *bla*_{NDM-1}, el cual es similar a otros plásmidos de *Acinetobacter* y Enterobacterias. No se obtuvieron transconjugantes ni transformantes. Se detectaron cinco cepas de *A. baumannii* aisladas del área de quemados, resistentes a carbapenémicos, estrechamente relacionadas, con el mismo perfil plasmídico y portadoras de OXA-51 y OXA-23. La cepa *A. baumannii* AN71 porta diversos determinantes de resistencia, así como un plásmido llamado pAbaAN71 portando *bla*_{OXA-72}. Del Hospital Regional I.S.S.T.E. Puebla se trabajaron parcialmente 15 cepas, provenientes de urocultivos (27%), hemocultivos

(13%) y heridas (13%) de pacientes de la unidad de cuidados intensivos (33%) y de la unidad de medicina familiar (20%). Se tipificaron 11 cepas encontrando primordialmente especies del complejo *Acb* extremadamente resistentes y portadoras de OXA-51, OXA-23 y OXA-24.

Conclusión: Por primera vez se reportan en un hospital (HNP) la presencia de *A. haemolyticus* a diferencia de otros hospitales donde predomina *A. baumannii*. Se encontraron cepas de *A. haemolyticus* con nuevas variantes de betalactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos; además, presentaron bombas de eflujo participando en la resistencia, que no han sido reportado en esta especie, así como la presencia de un nuevo plásmido portando *bla*_{NDM-1}. Los hallazgos reportados en este estudio proporcionan información sobre la diversidad de mecanismos de resistencia a antibióticos y de especies de *Acinetobacter* en los hospitales, demostrando que la vigilancia de la resistencia debe realizarse individualmente en cada unidad hospitalaria.

Palabras clave: *Acinetobacter* spp., mecanismos de resistencia, plásmidos, bombas de expulsión.

ABSTRACT

Introduction: The genus *Acinetobacter* is a heterogeneous group of bacteria of environmental origin that are associated with hospital and community infections, specifically those of the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb) complex, of which *A. baumannii* is the most studied. However, other non-*baumannii* species, such as *A. haemolyticus*, have gained medical and epidemiological importance. These microorganisms have antibiotic resistance due to intrinsic and acquired mechanisms their genetic flexibility has made them difficult to eradicate bacteria from the hospital environment, with few treatment options that increase the morbidity and mortality of patients.

Objective: Study the clonal diversity and resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from Hospitals of Puebla.

Material and Methods: Strains of hospitalized and outpatients were collected during the 2009-2018 period. The strains were typified by Vitek2 and partial sequencing of the *rpoB* gene. Antibiotic sensitivity tests by Kirby-Bauer and minimum inhibitory concentration in the presence and absence of efflux pump inhibitor were performed. The clonal relationship was determined by pulsed-field electrophoresis (PFGE) and sequence type (ST). Resistance genes were identified by PCR and sequencing. The genome of two strains carrying carbapenemases was sequenced and genes involved in the resistance to antibiotics were identified. Plasmid extraction and characterization were performed. *bla*_{NDM-1} was detected by Southern blot. Conjugation and transformation assays were performed

Results: 67 strains of the Hospital para el Niño Poblano were studied, of which 66% were from dialysis fluids and 16% wounds from inpatients of the unit of internal medicine and emergency mainly. The typified species were: 30 *A. haemolyticus*, 23 of the Acb complex and a strain of each of the following species: *A. oleivorans*, *A. venetianus*, *A. grimontii*, *A. indicus*, *A. Iwoffii*, *A. radioresistens*, and *A. ursingii*. The *A. haemolyticus* strains did not show clonal relationship and carried beta-lactamases of the OXA-214-like family, the new variants OXA-575 (13%), TEM-229 (75%) and three new aminoglycoside modifying enzymes: 4% AAC(6')-Iga, 13% AAC(6')-Igb, and 42% AAC(6')-Igc. Polymorphism in CarO porin was evident interspecies. The participation of expulsion pumps in antibiotic resistance was demonstrated for the first time in *A. haemolyticus*. In AN54 strain the plasmid pAhaeAN54e carrying *bla*_{NDM-1} was characterized, which is like other plasmids of *Acinetobacter* and *Enterobacteriaceae*. No transconjugants or transformants were obtained. Five strains of *A. baumannii* were isolated from the burn area, they were closely related, with the same plasmid profile and resistant to carbapenems, carrying OXA-51 and OXA-23. In strain *A. baumannii* AN71 it carries diverse resistance determinants, as well as a plasmid called pAbaAN71 harboring OXA-72. From the Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, 15 strains were studied, from urine cultures 27%, blood cultures 13% and wounds 13% from the intensive care unit 33% and family medicine unit 20%. Three *A. baumannii* strains were partially studied carrying OXA-51, OXA-23, and OXA-24.

Conclusion: For the first time the presence of strains of *A. haemolyticus* causing infections is reported in a hospital, unlike other hospitals where *A. baumannii* predominates. New variants of genes coding beta lactamases and aminoglycoside modifying enzymes in *A. haemolyticus* strains; In addition, they presented efflux pumps participating in the resistance, which has not yet been reported in this specie, as well as the presence of a new plasmid with *bla*_{NDM-1}. These results provide information on the diversity of antibiotic resistance mechanisms and *Acinetobacter* species in hospitals, demonstrating that resistance monitoring should be performed individually in each hospital unit.

Keywords: *Acinetobacter* spp., resistance mechanisms, plasmids, efflux pumps.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud y agentes causales

En el ambiente Hospitalario, las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) son un problema importante de salud pública de gran impacto económico y social, son de importancia clínica y epidemiológica debido a que propician altas tasas de morbilidad y mortalidad, el incremento en los días de hospitalización y de los costos de atención (Sosa-Hernández *et al.*, 2019). Se presentan principalmente en unidades de cuidados intensivos (UCI) debido a que los pacientes que ahí se reciben tienen diversas patologías asociadas, están inmunocomprometidos y bajo tratamiento con diferentes tipos de medicamentos incluyendo antibióticos, lo que representa para los microorganismos un ambiente al que se deben adaptar para sobrevivir. No obstante no hay que dejar de lado a los pacientes ambulatorios con enfermedades crónicas que han sido multi tratados y que frecuentemente presentan infecciones recurrentes por microorganismos multidrogosresistentes (Llaca-Díaz *et al.*, 2013; RHOVE, 2013).

Los microorganismos causantes de estas infecciones pertenecen a diferentes géneros bacterianos del grupo ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterias); sin embargo, en las UCI de Estados Unidos, las bacterias Gramnegativas son las responsables del 70% de las infecciones, siendo las más comunes las de la familia Enterobacteriaceae (Morfin-Otero *et al.*, 2012). Alarmantemente, en todo el mundo son cada vez más frecuentes los informes de infecciones por bacterias Gramnegativas No fermentadoras resistentes a múltiples fármacos, como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) o productoras de carbapenemasas (RHOVE, 2012; Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014).

Si bien *A. baumannii* y *P. aeruginosa* son los microorganismos No fermentadores más frecuentemente aislados en los hospitales, no se deben desatender a otros

bacilos Gramnegativos emergentes causales de infecciones esporádicas así como grandes brotes, dentro de los que se encuentran *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* (Flores-Treviño *et al.*, 2014; Looney *et al.*, 2009).

1.2 Características del género *Acinetobacter* y su importancia clínica

El género *Acinetobacter* son cocobacilos Gramnegativos No fermentadores, aerobios estrictos, catalasa positiva, oxidasa negativa, no esporulados, la mayoría de los aislamientos no fermentan la glucosa y son inmóviles; sin embargo, se ha informado que, en medios semisólidos, llegan a presentar movimiento tipo *twitching*. Y su genoma tienen un contenido de G+C del 39% (Doughari *et al.*, 2011).

Consta de diversas especies dentro de las que se encuentran *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter especie genómica 3 (A. pittii)*, *Acinetobacter especie genómica 13TU (A. nosocomialis)* y *A. seifertii* que juntas conforman el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb) (Nemec *et al.*, 2015, Nemec *et al.*, 2011).

Las principales especies implicadas en IAAS son aquellas que pertenecen al complejo Acb; sin embargo, cada vez son más los reportes de especies de *Acinetobacter no-baumannii* que se les asocia a infecciones, algunas de ellas son: *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. Iwofii*, *A. ursingii* y *A. schindleri* (Doughari *et al.*, 2011; Périchon *et al.*, 2014). La mayoría de estos microorganismos son ambientales aislados de suelo, agua, animales, frutas y vegetales y no se asociaban con enfermedades humanas; pero, en los hospitales las fuentes inanimadas más comunes de aislamiento de este tipo de microorganismos son los equipos de ventilación mecánica, succionadores, colchones, almohadas, humidificadores, contenedores de agua, mesas, lavamanos, bombas de infusión y equipos de nutrición. También, se ha descrito que alrededor del 30% de los profesionales de la salud presentan colonización transitoria de *A. baumannii* en las manos (Berlau *et al.*, 1999; Giamarellou *et al.*, 2008; Pinzon *et al.*, 2011).

El género *Acinetobacter* está implicado en una amplia gama de infecciones del tracto respiratorio y urinario, torrente sanguíneo, piel y tejidos blandos, y

contaminación de dispositivos protésicos, etc. y son un problema particular en las UCI, donde numerosos brotes han sido extremadamente difíciles de controlar debido a que exhibe factores de virulencia y mecanismos de resistencia a múltiples fármacos propiciando la adaptación exitosa al ambiente hospitalario, convirtiéndose en un grave problema a nivel mundial (Richardson *et al.*, 2011; Jeannot *et al.*, 2014).

1.3 Taxonomía de *Acinetobacter*

El concepto de especie biológica crea desafíos para muchos organismos, desde grandes mamíferos hasta bacterias; pero las bacterias se ven particularmente afectadas porque las características fenotípicas que pueden usarse para su clasificación son limitadas. Desde un punto de vista clínico, la descripción y clasificación de las bacterias es de gran importancia cuando se trata de identificar agentes patógenos, lo que determina las características epidemiológicas útiles para su tratamiento y prevención. Además, la catalogación de especies puede revelar rastros sobre evolución, transformación y extinción de linajes bacterianos; e incluso el papel de diferentes mecanismos en la diferenciación genética y el camino de adaptación a nuevos nichos (Bryant *et al.*, 2012; Riley *et al.*, 2009). Y un ejemplo del problema que representa este tipo de clasificación es el género *Acinetobacter*.

No se sabe cuándo ocurrió el primer aislamiento de microorganismos del género, los cocobacilos Gramnegativos que probablemente eran *Acinetobacter* se aislaron en 1914 y repetidamente durante la década de 1940, pero anteriormente se les conocía como *Mima polymorpha* (ahora *Acinetobacter lwoffii*), *Herellea vaginicola* (ahora *A. baumannii* o *A. calcoaceticus*), *Bacterium anitratum* y *Moraxella lwoffii* (Wong *et al.*, 2017). Y hasta hace muy poco distinguir *A. baumannii* de *A. calcoaceticus* era difícil, sin embargo, gracias al constante desarrollo de metodologías que permiten comprender de mejor manera la constitución genómica del microorganismo, se ha logrado una mayor aceptación de su clasificación taxonómica (Mateo-Estrada *et al.*, 2019). A la fecha, el género *Acinetobacter* pertenece al dominio: *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gamma Proteobacteria*, orden *Pseudomonadales* y familia *Moraxellaceae*. Y de acuerdo con la clasificación

de Alexandr Nemeč, el género está integrado actualmente por 63 especies con nombres válidos (<https://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>), aunque esta base de datos se va actualizando constantemente.

1.4 Identificación fenotípica y genotípica

Se han utilizado varios métodos fenotípicos y genotípicos de identificación de especies para el género *Acinetobacter*, el problema de la identificación de especies de este género tan versátil radica en que no hay una técnica simple para su caracterización adecuada (Diancourt *et al.*, 2010).

Los métodos manuales y semiautomatizados utilizados en la mayoría de los hospitales, que se basan en el metabolismo bacteriano como API® 20 NE, VITEK® 2 y Microscan® resultan ser poco útiles para la identificación de especies, sobre todo las que pertenecen al complejo Acb.

La espectrometría de masas MALDI-TOF es actualmente el método molecular de elección para la identificación rápida de especies bacterianas; sin embargo, no puede diferenciar de manera confiable entre algunas especies estrechamente relacionadas, como el complejo Acb (Marí-Almirall *et al.*, 2017). Otras técnicas destacadas son los métodos de hibridación de ADN-ADN, algunos marcadores filogenéticos como 16S rRNA, *recA*, *gyrB*, siendo la amplificación de una región de ≈350 pb del gen *rpoB* la más utilizada para la tipificación de cepas de *Acinetobacter* spp. Recientemente se ha aplicado la secuenciación del genoma completo (WGS) junto con la metodología de la identidad de nucleótidos promedio (ANI) (Diancourt *et al.*, 2010; La Scola *et al.*, 2006; Mateo-Estrada *et al.*, 2019b; Touchon *et al.*, 2014).

1.5 Tratamiento, prevención y control de infecciones causadas por *Acinetobacter*

Las cepas de *Acinetobacter* se clasifican según la resistencia que presentan a los antibióticos con los que son tratados. Las cepas multirresistentes (MDR) son aquellas que no presentan sensibilidad a uno o más antibióticos dentro de tres o más categorías antimicrobianas. Las extremadamente resistentes (XDR) que no presentan sensibilidad a uno o más antibióticos en todas, excepto en dos o menos categorías antimicrobianas y las Pan resistentes (PDR) que no presenta sensibilidad a ninguno de los antibióticos empleados (Magiorakos *et al.*, 2012).

El tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter* debe individualizarse de acuerdo con los patrones de sensibilidad. Una opción de tratamiento para infecciones causadas por *Acinetobacter* es ampicilina/sulbactam que ha mostrado ser eficaz en las infecciones del torrente sanguíneo, del tracto urinario y de las vías respiratorias (Smolyakov *et al.*, 2003). Se ha utilizado la sinergia que presentan algunos antibióticos, como fluoroquinolonas y doxiciclina, aminoglucósidos con betalactámicos aunado a un inhibidor de betalactamasas y la sinergia entre quinolonas y amikacina (Doughari *et al.*, 2011).

Aunque los carbapenémicos son antibióticos efectivos para tratar infecciones graves por *A. baumannii* MDR, la tasa de cepas resistentes a ellos ha ido aumentando gradualmente, por lo que para combatir cepas *A. baumannii* MDR o PDR, las terapias incluyen colistina/imipenem, colistina/meropenem, colistina/rifampicina, colistina/tigeciclina, colistina/teicoplanina, pero desafortunadamente, la toxicidad renal de la colistina ha hecho que su elección sea de última opción de tratamiento (Lee *et al.*, 2017).

Debido a este panorama no debemos olvidar prevenir este tipo de infecciones. La prevención radica en la implementación rápida de los procedimientos de control de infecciones, tales como el lavado de manos, el aislamiento del paciente, el adecuado cuidado de los dispositivos (respiradores, catéteres, sondas), la limpieza

del hospital (desinfección ambiental), la higiene del personal a cargo, control antimicrobiano e incluso el cierre de la unidad para evitar que el microorganismo sea transmitido a otros pacientes y se vuelva endémico de la institución. Al mismo tiempo se debe considerar seriamente tanto por las instituciones de investigación como por las compañías farmacéuticas la inversión en nuevas sustancias antibióticas con posible actividad contra *Acinetobacter spp.* con el fin de obtener un tratamiento alternativo (Mehta *et al.*, 2014).

1.6 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Las cepas Multirresistentes (MDR) de *A. baumannii* han surgido en las últimas décadas como resultado de la combinación de factores como son: un alto nivel de competencia natural para incorporar ADN exógeno, mutaciones y la sobreexpresión asociada a secuencias de inserción del tipo IS*Aba* (Touchon *et al.*, 2014).

Los mecanismos de resistencia a antibióticos que se encuentran reportados en *A. baumannii* incluyen la impermeabilidad de la membrana celular, presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico, inactivación o modificación del agente antimicrobiano y modificación o protección de los sitios diana de antibióticos (Esterly *et al.*, 2011).

1.6.1 Inactivación o alteración del antibiótico

La inactivación de antibióticos betalactámicos por betalactamasas es un importante mecanismo de resistencia en *A. baumannii*. Las cuatro clases de betalactamasas (A, B, C y D) se han identificado en *A. baumannii* (Kaur *et al.*, 2018).

Las betalactamasas de clase A (Serin-betalactamasas) en su mayoría inhibidas por ácido clavulánico hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de manera más eficiente que carbapenémicos, excepto algunas enzimas tipo GES y KPC (Jones *et al.*, 2015). En *A. baumannii* se han identificado una gran cantidad de este tipo de enzimas, incluyendo TEM, SHV, GES, CTX-M, SCO, PER, VEB, KPC y CARB (Glupczynski *et al.*, 2010; Moubareck *et al.*, 2009).

La clase B ó metalo-betalactamasas requieren zinc para su catálisis. Debido a su amplio espectro de sustratos, catalizan la hidrólisis de prácticamente todos los antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos, pero no monobactámicos (Jones *et al.*, 2015). Se han identificado en *A. baumannii*: IMP-1, 2, 4, 5, 6, 11, 19, 24; VIM-1, 2, 3, 4, 11; NDM-1, 2, 3; SIM-1 (Karah *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2013).

Las betalactamasas clase C plantean problemas terapéuticos porque pueden conferir resistencia a las cefamicinas (cefoxitina y cefotetan), penicilinas, cefalosporinas e inhibidores de betalactamasas. (Jeon *et al.*, 2015). *A. baumannii* tiene una betalactamasa clase C intrínseca derivada de AmpC nombrada ADC (*Acinetobacter* derived cephalosporinase) (Poirel *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2014).

Especialmente este género es portador de las betalactamasas clase D llamadas OXAs (Oxacilinasas) porque comúnmente hidrolizan oxacilina mucho más rápido que la bencilpenicilina (Jones *et al.*, 2015). Más de 400 variantes se han identificado, algunas con actividad carbapenemasa. Las familias de OXA que hidrolizan carbapenémicos OXA-23, OXA-24, OXA-51 y OXA-58 son prevalentes en *A. baumannii* (Brown *et al.*, 2006). En otras especies, también se han encontrado como, por ejemplo, *A. johnsonii* con OXA-211, *A. calcoaceticus* con OXA-213 y *A. haemolyticus* con OXA-214 (Figueiredo *et al.*, 2011).

Se han descrito en *Acinetobacter* genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos que pueden ser acetiltransferasas (*aacC1*, *aacC2*, *aacA4*, *aac(6')-Iad*, *aac(6')-Im*, *aac(6')-II*), nucleotidiltransferasas (*aadB*, *aadA1* y *aadA4*) y fosfotransferasas *aphA1*, *aphA6* y *aphA15*), que se pueden encontrar formando parte de integrones, transposones y éstos a su vez estar presentes en grandes islas de resistencia, plásmidos o en el cromosoma (Patel *et al.*, 2013; Hamidian, 2011; Jeannot *et al.*, 2014; Traglia *et al.*, 2014; Cho *et al.*, 2009; Hamidian *et al.*, 2014).

1.6.2 Modificación del sitio blanco

Las mutaciones en los genes cromosómicos *gyrA* y *parC* son asociados a la resistencia a quinolonas, al igual que en otros géneros bacterianos, difiriendo únicamente en las posiciones de los aminoácidos en las que se presentan los siguientes cambios. Los que se han reportado en *Acinetobacter baumannii*: Ser83Leu, Gly81Val, Ala84Pro, Gly81Asp en GyrA y Ser80Leu, Glu84Lys y Gly78Cys en ParC (Ardebili *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 1997).

1.6.3 Bombas de expulsión

Otro de los mecanismos de resistencia con los que cuenta *Acinetobacter* es la sobreexpresión de los sistemas de eflujo, uno de ellos AdeABC relacionado con la expulsión de múltiples antibióticos, como aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina, fluoroquinolonas, tetraciclinas, trimetoprim y algunos betalactámicos, incluyendo cefotaxima (Yoon *et al.*, 2015). Por otro lado, la bomba AdeIJK se ha relacionado con la eliminación de tetraciclinas desde el interior de *A. baumannii* y se ha demostrado que disminuye la CMI de tetraciclina, minociclina y tigeciclina, respectivamente, cuando es inhibida. La combinación de AdeABC y AdeIJK aumenta la resistencia a tetraciclinas y la interrupción de ambos al mismo tiempo resulta en una disminución de CMI para diversos antibióticos. (Damier-Piolle *et al.*, 2008; Coyne *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2007). Se ha reportado que la bomba AdeDE confiere resistencia a amikacina, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacino, eritromicina, meropenem, rifampicina y tetraciclina en cepas de *A. pittii* (Chu *et al.*, 2006).

Uno de los mecanismos de resistencia a tetraciclinas son las bombas de eflujo tipo Tet, de las cuales las más frecuentes son TetA, que se asocia con la resistencia a la tetraciclina, siendo la variante TetA-39 un importante mecanismo de resistencia en cepas clínicas, y TetB que está implicado en la resistencia a la tetraciclina, doxiciclina y minociclina en aislados clínicos (Rumbo *et al.*, 2013; Martí *et al.*, 2006).

Otro mecanismo de resistencia a tetraciclinas es el gen de protección ribosomal, *tetM* que confiere resistencia a la minociclina y rara vez se ha identificado en

aislados clínicos de *A. baumannii*. Es de importancia saber que se ha demostrado que *tetM* es 100% homólogo con el gen de *S. aureus* y puede representar la transferencia de mecanismos de resistencia entre los dos géneros diferentes. Los mecanismos de resistencia genéticos tales como bombas de eflujo y la protección ribosomal pueden ser aditivos o multiplicativos observándose en el fenotipo de resistencia a tetraciclinas (Esterly *et al.*, 2011; Rumbo *et al.*, 2013; Vila *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015).

1.6.4 Cambios de permeabilidad de la membrana

Uno de los mecanismos de resistencia que ha sido asociado con la modificación de la CMI de carbapenémicos es la pérdida o interrupción mediante secuencias de inserción IS*Aba* de una proteína de membrana externa llamada CarO. Esta porina puede estar cumpliendo un papel similar a OprD en *P. aeruginosa* confiriéndole resistencia a carbapenémicos (Lee *et al.*, 2011; Zahn *et al.*, 2015).

Finalmente, si bien se sabe que *Acinetobacter* forma biopelícula como mecanismo de virulencia, también dificulta la permeabilidad de los antibióticos hacia su sitio blanco, aunado a los otros mecanismos de resistencia dan como resultado tratamientos ineficaces, sin embargo, la participación de la biopelícula en la resistencia a antibióticos aún debe ser estudiada a fondo (Rumbo *et al.*, 2013; Pour *et al.*, 2011).

1.7 Elementos genéticos móviles e islas genómicas de resistencia

Los integrones desempeñan un papel importante en la diseminación de genes de resistencia y en *Acinetobacter* se han detectado integrones clase 1 y clase 2 conteniendo genes codificantes de BLEEs y enzimas modificadoras de aminoglucósidos y estos a su vez integrados en plásmidos ó en el cromosoma (Esterly *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012). Algunos de los plásmidos ya han sido secuenciados evidenciando la presencia de genes de resistencia provenientes de otros géneros bacterianos, demostrando la transferencia de material genético, sin

embargo, son pocos los estudios donde se ha realizado su caracterización. (Bogaerts *et al.*, 2010; Higgins *et al.*, 2010; Moubareck *et al.*, 2009). Actualmente existe una tipificación de plásmidos de *Acinetobacter* basada en su replicón (Bertini *et al.*, 2010); no obstante no todos los plásmidos que porta esta bacteria pueden ser clasificados por esa metodología, por lo que se requieren más investigaciones sobre plásmidos de *Acinetobacter*.

En *A. baumannii* es frecuente encontrar islas de resistencia, que son grandes fragmentos para la adquisición y acumulación de genes de resistencia a antibióticos. En un estudio realizado por Fournier y colaboradores en el 2006, compararon los genomas de dos aislados de *A. baumannii*, uno sensible y otro resistente, y reportaron una gran variedad de genes que confieren resistencia. En el aislamiento resistente, se identificó una región de 86 kb denominada isla de resistencia AbaR1, con 45 genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y bombas que expulsan tetraciclinas; también dos operones completos, uno asociado con la resistencia a arsénico y el segundo con la resistencia a mercurio. El análisis genético de AbaR1 mostró que está compuesta de transposones y otros genes que ya se habían identificado en *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, y *E. coli*. La isla AbaR1 se integra en un gen de competencia *comM* en el dominio ATPasa en el genoma de la bacteria (Fournier *et al.*, 2006). Debido a eventos de delección, inserción o recombinación se ha demostrado que han surgido nuevas variantes de AbaR's que han evolucionado conformando más de 19 islas diferentes (Krizova *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

La diversidad de bacilos Gramnegativos es variable en cada hospital debido al constante dinamismo de la microbiota circulante, así como de las medidas preventivas y de erradicación cuando se presenta un brote, por lo tanto existen estudios a nivel mundial acerca de la sensibilidad y los diferentes mecanismos de resistencia que exhiben cepas de *Acinetobacter* y otros bacilos Gramnegativos No Fermentadores en áreas hospitalarias (Liu, 1997; Maragakis *et al.*, 2008; Rafei *et al.*, 2014)

En 2003, los porcentajes de sensibilidad a antibióticos en Latinoamérica correspondían al 96% para polimixinas, 83% para carbapenémicos, 20% para cefalosporinas de tercera y cuarta generación, 50% para tetraciclinas y 32% para quinolonas y aminoglucósidos. Cinco años después, en Colombia, se reporta un incremento de los porcentajes de resistencia a carbapenémicos, quinolonas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y aminoglucósidos (60-70%, 70%, 40-70% y 40% respectivamente) (Tognim *et al.*, 2004).

En Europa se presentaron brotes hospitalarios por tres clonas de *A. baumannii* en países como España, República Checa, Polonia, Italia, Portugal, Grecia, Francia, Turquía y Holanda. Se reportó que estas clonas también causaron brotes en países de otros continentes como Estados Unidos, África del Sur, Israel y Australia (van Dessel *et al.*, 2004; Villalón *et al.*, 2015). En Latinoamérica, el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY reporta que las tasas de resistencia a antibióticos por *A. baumannii* es mayor que las reportadas en Europa y Estados Unidos, documentándose brotes en Brasil, Uruguay, Chile, México y Colombia (Morfín-Otero *et al.*, 2013; Tognim *et al.*, 2004).

Un evento importante que detonó la investigación epidemiológica de clonas de *Acinetobacter* se dio en el año 2003 durante una infección masiva de soldados estadounidenses mientras combatían en Iraq y que presentaron infecciones por

cepas del complejo Acb. Mediante PFGE de las cepas aisladas de los pacientes y muestras ambientales, se detectaron 5 grupos y al determinar la sensibilidad a los antimicrobianos se encontró que las muestras ambientales fueron generalmente más sensibles que las muestras clínicas las cuales expresaron resistencia a fluoroquinolonas, cefalosporinas y piperacilina/tazobactam y alrededor del 90% presentó sensibilidad a imipenem, polimixina B y colistina (Scott *et al.*, 2007).

Higgins y colaboradores en 2010 investigaron la epidemiología molecular y la distribución de los genes que codifican para carbapenemasas en 492 aislados de *A. baumannii* no sensibles a imipenem en el mundo (Norte y América Latina, Europa, Asia, Sudáfrica y Australia). Se encontraron ocho clonas predominantes y algunas de éstas eran portadoras de OXA-51 sobreexpresada por *ISAbal1* y en algunas de las cepas se demostró la presencia de otras carbapenemasas adquiridas como OXA-23, OXA-40 y OXA-58. Diversos estudios evidencian que *Acinetobacter* también ha adquirido genes que codifican para enzimas metalo-beta-lactamasas como IMP, VIM, NDM, SPM, GIM y diversas BLEEs como TEM, SHV, CTX-M, VEB, PER, GES y KPC en elementos genéticos movilizables (Gonzalez *et al.*, 1998; Higgins *et al.*, 2010; Queenan *et al.*, 2007; Tognim *et al.*, 2004; Moubareck *et al.*, 2009; Robledo *et al.*, 2010).

En México, son pocos los grupos que han estudiado cepas de *A. baumannii*, como los de Garza-González, Alcántara-Curiel y Silva-Sánchez. Ellos realizaron investigaciones en hospitales del norte del país en los que analizaron el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos, reportando cepas resistentes a ciprofloxacino, levofloxacino, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, gentamicina, amikacina, tetraciclina y colistina, además de un incremento en la resistencia a carbapenémicos. Encontraron que algunas cepas portaban OXA-51, OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-72, flanqueados por la secuencia de inserción *ISAbal3* y el sitio de recombinación *XerC*, que se ha visto, pueden movilizar y sobreexpresar genes. También se encontró la metalo-beta-lactamasa VIM-2. Además demostraron fenotípicamente que la presencia de bombas de expulsión de tipo AdeABC en

presencia del inhibidor CCCP (Carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona) disminuía la CMI de imipenem y meropenem (Alcántar-Curiel *et al.*, 2014; Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015; Garza-González *et al.*, 2010; Llaca-Díaz *et al.*, 2013; Mendoza-Olazarán *et al.*, 2014).

Recientemente se publicó un trabajo de Mancilla-Rojano *et al.*, 2019 del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” en colaboración con el Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, en el que los investigadores secuenciaron el genoma de cinco cepas provenientes de un mismo paciente pediátrico con leucemia M2. La primera cepa se aisló el 7 de enero de 2015 de heces (cepa 810CP), posteriormente, se aislaron tres cepas adicionales el 11 de enero de 2015 de torrente sanguíneo en diferentes momentos (cepas 433H, 434H y 483H), y una cepa final se aisló el 12 de enero de 2015 de líquido cefalorraquídeo (cepa A-2) post mortem.

Estudiaron mecanismos de resistencia a antibióticos, plásmidos, genes de virulencia, así como la genómica comparativa de las cepas; encontrando que todas mostraron perfiles de resistencia similares a múltiples fármacos (MDR), portaban OXA-51, OXA-23, IS*Aba1* y bombas de expulsión de la familia RND. Perteneían al ST758 y por PFGE mostraron relación clonal. Los resultados de la genómica comparativa arrojaron que compartían el 86% de los genes, pero diferían en más de 10 SNVs (*Single Nucleotide Variant*), específicamente la cepa 810CP fue la más diferente en relación con los genes de virulencia, lo que sugiere dos posibles interpretaciones, que el paciente se infectó con varias cepas estrechamente relacionadas o que las diferencias genéticas se adquirieron con el tiempo, lo que demostraría que el genoma de *Acinetobacter* es altamente dinámico y que el recambio genético desempeña un papel crucial en la configuración del genoma de este microorganismo. Con este tipo de trabajos donde se utiliza la secuenciación masiva, se obtienen datos valiosos que permiten conocer el fondo genético de cepas resistentes circulantes en los hospitales mexicanos.

3. JUSTIFICACIÓN

La emergencia de bacilos Gramnegativos No fermentadores, especialmente *Acinetobacter* spp multirresistentes en áreas hospitalarias, debe ser estrechamente vigilada, ya que debido a su plasticidad genómica y a la transferencia de material genético han sido capaces de adaptarse a ambientes hostiles y complicar su erradicación, propiciando un incremento de días de hospitalización, infecciones recurrentes, baja efectividad del tratamiento antimicrobiano, e incluso la muerte de los pacientes.

En México existen pocos estudios acerca de cepas de *Acinetobacter* spp., de su diversidad clonal, así como de los genes asociados a la resistencia a antibióticos y los elementos de diseminación, por lo que resulta importante conocer su distribución y realizar la caracterización de los mecanismos de resistencia que presentan los aislados de *Acinetobacter* spp causantes de infecciones en la ciudad de Puebla, México.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diversidad clonal y los mecanismos de resistencia a antibióticos en aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. de Hospitales Poblanos.

4.1 Objetivo Particular 1

Determinar la diversidad clonal y la resistencia fenotípica a antibióticos de cepas de *Acinetobacter* spp. de pacientes con IAAS en áreas hospitalarias y ambulatorios.

4.1.1 Objetivos Específicos

- ✓ Obtener cepas causantes de IAAS de hospitales y pacientes ambulatorios y confirmar su pureza.
- ✓ Determinar el perfil de resistencia a antibióticos.
- ✓ Tipificar molecularmente los aislados seleccionados.
- ✓ Determinar la relación clonal de las cepas *Acinetobacter* spp.

4.2 Objetivo Particular 2

Determinar los mecanismos moleculares de la resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter* spp. aisladas de pacientes de diferentes áreas hospitalarias y pacientes ambulatorios.

4.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Identificar los genes que codifican para la resistencia a betalactámicos, quinolonas, aminoglucósidos y tetraciclinas en algunas cepas de interés.
- ✓ Determinar mutaciones en genes cromosómicos relacionados con la resistencia a betalactámicos (Porina CarO) y a quinolonas (*gyrA* y *parC*) en algunas cepas de interés.

4.3 Objetivo Particular 3

Caracterizar los elementos genéticos movilizables implicados en la diseminación de resistencia a betalactámicos (incluidos carbapenémicos) en una selección de cepas.

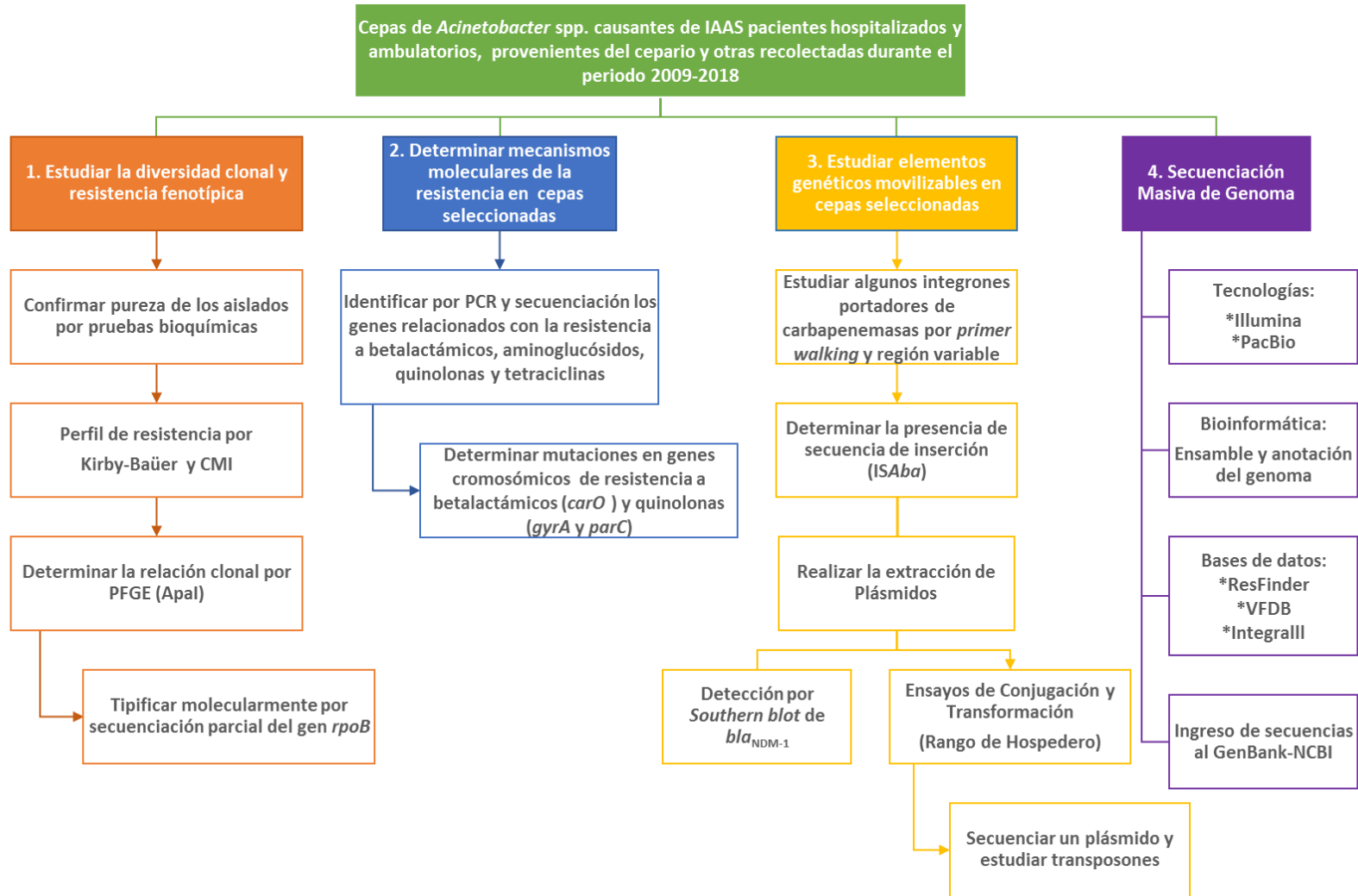
4.3.1 Objetivos específicos

- ✓ Estudiar integrones portadores de genes codificantes de carbapenemasas.
- ✓ Determinar la presencia de secuencias de inserción (*ISAb*) relacionadas con la sobreexpresión de genes de resistencia a betalactámicos.
- ✓ Determinar la presencia de plásmidos en algunas cepas portadoras de carbapenemasas.
- ✓ Detectar los genes involucrados en la resistencia a carbapenémicos.
- ✓ Determinar la transferencia de material genético mediante conjugación y transformación.
- ✓ Determinar el rango de hospedero de los plásmidos portadores de genes de resistencia
- ✓ Secuenciar un plásmido portador de carbapenemasas de importancia.

4.4 Objetivo Particular 4

- ✓ Realizar la secuenciación masiva y análisis bioinformático del genoma de dos cepas resistentes a carbapenémicos.

5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Cepas de estudio

Se estudiaron 67 cepas de *Acinetobacter* spp, de distintos sitios anatómicos de pacientes hospitalizados en el Hospital para el Niño Poblano durante el periodo septiembre de 2009 a septiembre de 2018. Adicionalmente se trabajaron 20 cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E Puebla del periodo mayo de 2015 a enero de 2018. Las cepas fueron previamente identificadas fenotípicamente con el sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux). Algunas ya se encontraban guardadas en el laboratorio de precedencia y las más recientes fueron recolectadas durante los cultivos de rutina.

En el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC) fueron identificadas con un número secuencial de acuerdo al cepario interno, se sembraron en placas de agar BHI (BD Bioxon®) y se incubaron 24 horas a 37°C. Posteriormente se tomó una colonia aislada y se sembró nuevamente en placas de TSA, Mac Conkey y CLED (Agar cistina-lactosa deficiente en electrolitos) (BD Bioxon®) para observar la morfología, se verificó el crecimiento hasta las 48h de incubación. Con el objetivo de confirmar su pureza, se les realizaron pruebas bioquímicas como TSI, citrato, MIO y O/F y tinción de Gram (Macfaddin, 2003).

Finalmente, las cepas puras se preservaron en crioviales con caldo BHI/Glicerol (30% v) (BIOXON®) a -70°C.

6.1.1 Declaración ética

El protocolo del presente estudio fue revisado minuciosamente y aprobado por los comités de bioética de los hospitales participantes, quedando registrado con los siguientes números:

- ✓ **Hospital para el Niño Poblano:** HNP/ENS/177/2016.
- ✓ **Hospital Regional IS.S.S.T.E. Puebla:** Proyecto Núm. 188.2018

La información de los pacientes se manejó de manera anónima. Las muestras fueron recolectadas durante procedimientos de rutina para el aislamiento bacteriano y no representaron riesgos adicionales para los pacientes.

Las cepas fueron transportadas bajo cadena de custodia, en apego a las normas: WHO/HSE/GCR/2012.12, NOM-051-SCT2/201, NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y NOM-052SEMARNAT-2005.

6.1.2. Cepas control y cepas receptoras para conjugación y transformación

Se usaron distintas cepas como control positivo para la amplificación de los diferentes genes de resistencia (**Tabla 1**). Los genes que portan dichas cepas control están secuenciados. Para los ensayos de transferencia de material genético se utilizaron como receptoras dos cepas de *E. coli* (**Tabla 2**).

Tabla 1. Cepas control

Número de cepa	Microorganismo	Genes que portan	Donada por
IMP-15	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{IMP-15}	Dr. Jesús Silva Sánchez
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}	Dr. Jesús Silva Sánchez
AN54	<i>A. haemolyticus</i>	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-265} , <i>aphA6</i> , <i>aac</i> -(6')-Ilg	Reportada en este trabajo
AN3	<i>A. haemolyticus</i>	<i>bla</i> _{TEM-229} , <i>bla</i> _{OXA-575} , <i>aac</i> -(6')-Igc	Reportada en este trabajo
Ps52	<i>P. aeruginosa</i>	<i>int11</i> , <i>sul1</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>bla</i> _{GES-19/20} , <i>aac</i> -(6')-Ib, <i>bla</i> _{OXA-2}	M.C. María Elena Bello López
19.0	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1}	Biol. Gabriela Moreno Ramírez
560	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{SHV-1}	D.C. Gerardo Cortés Cortés
SA42	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>aac</i> (3)-IIa, <i>aac</i> -(6')-Ib, <i>qnrB1</i>	M.C. Gabriel Abraham González
Ab23	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51} y <i>bla</i> _{OXA-23} control para PFGE	Dr. Jesús Silva Sánchez
Ab24	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> _{OXA-51} y <i>bla</i> _{OXA-24}	Dr. Jesús Silva Sánchez
A11616	<i>A. haemolyticus</i>	<i>bla</i> _{OXA-214} , control para PFGE y plásmidos (7.5 kb, 6.5 kb, 5.1 kb, 3.3 kb).	Dr. Miguel Ángel Cevallos
NCTC50192	<i>E. coli</i>	Cepa de referencia con 4 plásmidos 154 kb, 66 kb, 38 kb y 7 kb	Dr. Ulises Garza Ramos

Tabla 2. Características de las cepas receptoras para conjugación y transformación

Número de cepa	Microorganismo	Fenotipo	Donada por:
C600 ^{Rif}	<i>E. coli</i>	Resistente a rifampicina	Dra. Beatriz Eugenia Baca
DH5α ^{NA}	<i>E. coli</i>	Resistente a ácido nalidíxico	Dr. Miguel Castañeda Lucio

6.2. Métodos de sensibilidad a antibióticos

6.2.1 Perfil de resistencia por el método de Kirby-Bauer

El perfil de resistencia se realizó por el método de difusión con disco, se probaron 17 antibióticos usados en el área clínica. Se partió de un cultivo puro de 24 horas que fue sembrado en placas de agar soya tripticasa (TSA), se preparó una suspensión bacteriana en solución salina isotónica (SSI) y se ajustó a una turbidez igual al tubo 0.5 de McFarland, se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril en una placa de agar Mueller-Hinton (MH) (BD Bioxon®), y en seguida se colocaron

los discos de antibióticos (BD BBL®). Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas y posteriormente se midieron los halos de inhibición clasificando a las cepas de acuerdo con los puntos de corte propuestos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por su siglas en inglés) versión 2018 (Wayne, 2018) (Tabla 3).

Tabla 3. Puntos de corte del CLSI, 2018 para *Acinetobacter* spp.

Familia química de antibiótico	Antibiótico	Abreviatura	Concentración (µg)	R	I	S
Penicilinas	Piperacilina	PIP	100	≤17	18-20	≥21
	Ticarcilina	TIC	75	≤14	15-19	≥20
Combinación β-lactámicos/Inhibidores de β-lactamasas	Ampicilina/Sulbactam	SAM	10/10	≤11	12-14	≥15
	Piperacilina/Tazobactam	TZP	100/10	≤17	18-20	≥21
	Ticarcilina/Ác. Clavulánico	TIM	75/10	≤14	15-19	≥20
Cefems (Incluyendo Cefalosporinas de I, II, III y IV)	Ceftazidima	CAZ	30	≤14	15-17	≥18
	Cefepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
	Cefotaxima	CTX	30	≤14	15-22	≥23
	Ceftriaxona	CRO	30	≤13	14-20	≥21
Carbapenems	Imipenem	IPM	10	≤18	19-21	≥22
	Meropenem	MEM	10	≤14	15-17	≥18
Aminoglucósidos	Gentamicina	GM	10	≤12	13-14	≥15
	Amikacina	AN	30	≤14	15-16	≥17
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	≤11	12-14	≥15
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	CIP	5	≤15	16-20	≥21
	Levofloxacino	LVX	5	≤13	14-16	≥17
Otros	Trimetoprim/Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16

6.2.2 Concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en agar (CMI)

Se partió de un cultivo puro de 18-24h en placas de TSA de las cepas a evaluar, se resuspendió en un tubo con 5mL de solución salina isotónica (SSI) al 0.85%, para ajustar la turbidez con un estándar igual al tubo 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se hizo una dilución 1:10 con SSI (siendo el inóculo de 1.5×10^7 UFC/mL) depositando por triplicado 2 μ L de ésta suspensión en placas de agar MH suplementadas con los antibióticos a evaluar (**Tabla 4**), el inóculo final fue de 1.5×10^4 UFC/mL. Una vez inoculadas las placas se esperó a que seicara el inóculo y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Finalmente se buscó la concentración a la cual ya no hubiera crecimiento de colonias; los puntos de corte se determinaron con base en el CLSI, 2018 y se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Puntos de corte de CMI para *Acinetobacter spp*

Antibiótico	Punto de corte CMI (μ g/mL)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
Cefotaxima (CTX)	≥ 64	16-32	≤ 8
Ceftriaxona (CRO)	≥ 64	16-32	≤ 8
Ceftazidima (CAZ)	≥ 32	16	≤ 8
Cefepime (FEP)	≥ 32	16	≤ 8
Meropenem (MEM)	≥ 8	4	≤ 2
Imipenem (IPM)	≥ 8	4	≤ 2
Ciprofloxacino (CIP)	≥ 4	2	≤ 1
Amikacina (AN)	≥ 64	32	≤ 16
Gentamicina (GN)	≥ 16	8	≤ 4

6.2.3 Concentración mínima inhibitoria en presencia y ausencia de Inhibidor de bombas de expulsión PA β N (L- Fenilalanina-Arginina- β -Naftilamida)

Para evaluar la participación de bombas de expulsión en algunas cepas se realizaron pruebas de sensibilidad para amikacina, cefotaxima, meropenem y ciprofloxacino por dilución en agar en presencia y ausencia de inhibidor de la bomba

de expulsión (EPI) L-Fenilalanina-Arginina- β -Naftilamida (PA β N, Sigma-Aldrich). El EPI se incorporó en el agar MH (BD Bioxon[®]) a una concentración de 25 mg/L. Se compararon los puntos de corte de las CMI en presencia y en ausencia de EPI, y una disminución ≥ 2 veces en las CIM para cada antibiótico se tomó como un cambio significativo y participación de las bombas en el fenotipo. Este experimento se realizó por triplicado (Kumita *et al.*, 2009).

6.2.4 Prueba de detección de Metallo- β -lactamasas para *Acinetobacter*

La prueba consistió en hacer una suspensión igual al tubo 0.5 McFarland a partir de un cultivo puro e inocular una placa de agar MH en forma masiva, posteriormente se colocó un sensidisco de MEM (Meropenem 10 μ g) (BD Bioxon[®]) y del lado opuesto otro disco del mismo antibiótico añadiéndole 10 μ L de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético 0.5M, pH 8); se repitió el mismo procedimiento, pero con sensidiscos de IPM (Imipenem 10 μ g). La prueba se tomó como positiva si se observaba un incremento en el diámetro del halo de inhibición (Bonnin *et al.*, 2012).

6.3 Tipificación molecular por *rpoB*

Debido a que las especies del género *Acinetobacter* presentan las mismas características fenotípicas en las pruebas bioquímicas, se realizó la tipificación molecular mediante la amplificación por PCR y secuenciación parcial del gen *rpoB* (La Scola *et al.*, 2006).

Para el análisis se usaron secuencias nucleotídicas de *rpoB* de diferentes especies de *Acinetobacter* depositadas en el GenBank, se alinearon con Clustal Omega y el dendograma se construyó con MEGA 7 por el método UPGMA, con 100 repeticiones.

Los oligonucleótidos que se emplearon se muestran en la **tabla 5**.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la tipificación molecular de cepas de *Acinetobacter* spp.

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>rpoB</i>	4074	Ac696-F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	397	94°C/2 min 94°C/30 seg 56°C/30 seg	35 ciclos La Scola <i>et al.</i> , 2006
		Ac1093-R	CMACACCYTTGTTMCCRTGA		72°C/1 min 72°C/7 min 10°C/∞	

6.4 Relación clonal por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE)

La relación clonal de las cepas de *A. hamolyticus* y de las cepas carbapenem-resistentes de *A. baumannii*, se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por (Durmaz *et al.*, 2009) con la modificación de que las cepas no fueron sembradas en agar sangre de carnero y que el corrimiento fue de 21 horas. A continuación, se describe la técnica usada en este trabajo:

- **Preparación de la suspensión bacteriana**

Se descongelaron las cepas de *Acinetobacter* y se sembraron en placas de TSA. Una vez que se verificó la pureza del cultivo se tomó una asada de la bacteria pura y se suspendió en 1 ml del buffer (CSB; 100 Mm Tris-HCl, (pH 8), 10 mM EDTA). Se ajustó a 4 de McFarland ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL). Se mantuvo la suspensión bacteriana a temperatura ambiente antes de ser mezclada con agarosa de bajo punto de fusión (no esperar más de 5 minutos).

- **Preparación de insertos**

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 2% con buffer CSB, se mantuvo a 45-50°C, se le agregó el SDS con una concentración final del 1%. Posteriormente se hicieron alícuotas de 200 µl en tubos de 1.5 ml (mantener los tubos a 45°C). Se tomó un volumen igual de la suspensión bacteriana (200 µl) y se mezclaron suavemente pipeteando 2 a 3 veces. Se depositaron cerca de 100 µl de esta mezcla en los moldes (10mm x 5mm x 1.5 mm) y se guardaron a 4°C por 10 minutos en el refrigerador.

- **Lisis de los insertos**

Para este paso se tomaron 500 µl de la solución de lisis 1 [CLS-1; 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, lisozima (2.5 mg/ml), proteinasa K (1.5 mg/ml), pH 8)] y se colocaron en un tubo eppendorf estéril. El inserto se transfirió a la solución de lisis 1 y se incubó a 37°C / 1 hora en baño con agitación. Los insertos se transfirieron a otro tubo conteniendo 500 µl de la solución de lisis 2 (CLS-2; 0.5 M EDTA (pH 8), 1% sarcosil y proteinasa K (400 µg/ ml) y se incubaron a 55°C / 2 horas en baño con agitación.

- **Lavado de insertos**

La solución de lisis se removió con cuidado y los insertos se lavaron 3 veces con agua ultra pura y 3 veces con 4 mL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, PH 7.6). Cada uno de estos lavados se realizó a 50°C/15 minutos en baño con agitación, después del último lavado se les agregaron 5 ml de buffer TE fresco y mantuvieron a 4°C hasta su uso.

- **Digestión con enzima *ApaI***

Se cortó la mitad del inserto y se colocó en un tubo de 1.5 mL conteniendo 100 µl del buffer de restricción (1X) con BSA (100 µg/mL) y se realizó una primera incubación a 37°C /10 minutos a baño maría, después se descartó el buffer y adicionaron 100 µl de buffer de restricción fresco junto con 30 U de la enzima *ApaI* (10 u/µl) y se incubaron a 37°C/ 2 horas.

- **Electroforesis en gel de agarosa**

La cubeta de electroforesis se llenó con 2 L de buffer TBE 0.5X frío y se dejó circular a 14°C, posteriormente se preparó un gel de agarosa al 1% con 100 mL de TBE 0.5X (44 mM Tris base, 44.5 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA, PH 8.0), se mantuvo el volumen restante de agarosa a 45- 50°C para sellar el gel. Se procedió a cargar los insertos y finalmente se adicionó la agarosa lentamente sin que se formaran burbujas y dejó solidificar, el gel se colocó en la cámara y se programó el equipo para el corrimiento con las siguientes condiciones.

Condiciones de electroforesis: Pulso inicial de 5 segundos y final de 30 segundos 6 V/cm durante 21 horas. Una vez finalizada la electroforesis se sacó el gel y se tiñó

con bromuro de etidio al 2% durante 10 minutos en agitación, después de destiñó con agua tridestilada y se tomaron fotografías cada 30 minutos durante 4 horas.

6.5 Extracción de ADN por el método de lisis por calor

Consiste en romper la célula sometiéndola a ebullición permitiendo la salida del material genético al medio acuoso; para lo cual se sembró una colonia aislada de *Acinetobacter spp.* en placas de TSA (BD Bioxon®), se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Del cultivo anterior se recogieron dos asadas y se depositaron en un tubo eppendorf que contenía 800 µL de solución salina isotónica estéril (0.85%), esta mezcla se homogenizó en vórtex a alta velocidad y posteriormente se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla bacteriana se lavó 3 veces más siguiendo el procedimiento anterior. Al finalizar los lavados se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 800 µL de agua inyectable estéril y se sometió a hervido en baño de agua durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se sacó el tubo y se dejó enfriar a temperatura ambiente, después se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos, y el sobrenadante se separó en un tubo eppendorf estéril.

6.6 Cuantificación de ADN

A todos los lisados se les realizó la cuantificación de ADN utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y usando la aplicación del instrumento, seleccionando la opción de Ácidos Nucleicos. Inicialmente el equipo realiza una verificación automática; se limpió el lector del equipo con papel y se procedió a hacer un blanco con 2 µL de agua inyectable estéril, una vez que se activó la casilla (Measure), se procedió a la medición de los lisados, se fue limpiando el lector óptico entre muestras para evitar contaminaciones. Los lisados que resultaron muy concentrados se diluyeron con agua inyectable estéril hasta ajustarlos a una concentración final de 250 ng/µL.

6.7 Amplificación de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de genes se usó la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific) con sus respectivos componentes que se enlistan en la **tabla 6**.

Tabla 6. Componentes para la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific)

Componentes	Concentración inicial	Volumen añadido por tubo (μL)	Concentración final de la reacción
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)	5U/ μL	0.08	0.04U
Buffer de reacción	10X	1	1X
MgCl ₂	25mM	1	2.5mM
dNTPs	10mM	0.3	0.3mM
Primer Forward	25 μM	0.3	0.75mM
Primer Reverse	25 μM	0.3	0.75mM
DNA	250 ng/ μL	1	25ng
Agua libre de nucleasas	---	Hasta 10 μL	---
Volumen final	---	10 μL	---

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diversos genes de resistencia y el entorno de las betalactamasas OXA-214-like se concentran en el **Anexo 1**.

En cada reacción de PCR se colocó un control negativo y un control positivo. El control negativo consistió en la misma mezcla de reacción, pero en lugar de ADN se colocó el correspondiente volumen de agua inyectable estéril y como control positivo se utilizó el ADN proveniente del lisado bacteriano de las cepas control (**Tabla 1**).

6.8 Visualización de productos de PCR

Los productos de PCR se visualizaron tras realizar electroforesis en geles de agarosa al 1% (o dependiendo del tamaño del producto) a 100 V por 30 min. Se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

(Invitrogen). Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (BET) (0.5 g/L) durante 5 minutos y lavados por 5 minutos en agua destilada; para visualizar los fragmentos de ADN, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

6.9 Secuenciación de los productos de PCR

Los productos amplificados se purificaron a partir del gel de agarosa con ayuda de Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos LANGEBIO en Irapuato, Guanajuato, México.

6.10 Análisis de las secuencias de productos de PCR

Las secuencias se visualizaron en el programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza. Para editar las secuencias se utilizaron los programas: Nucleic Acid Sequence Massanger (<https://www.cmbn.no/tonjum/seqMassanger-saf.htm>) y Sequence Utilities (<https://www.cmbn.no/tonjum/seqMassanger-saf.htm>).

El análisis comparativo de las secuencias se realizó con el programa Web BLAST del National Center for Biotechnology Information site (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y posteriormente para la construcción de los dendogramas se usó MEGA v7.0.21

La conversión de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos se realizó en ExPASy-Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>).

Para la predicción del modelo *in silico* de las nuevas betalactamasas y porinas CarO, se utilizaron los programas Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) y Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) y fueron visualizados con Chimera tool (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>).

6.11 Extracción de plásmidos por el método QuickPrep

La extracción plasmídica se realizó con la técnica QuickPrep modificada en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos. Se partió de un cultivo puro en 3 mL de caldo LB (BD Bioxon) que fue incubado 24 horas/ 37°C, se vertió en un tubo eppendorf y se centrifugó 12,000 r.p.m. durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, al paquete celular se le agregó 1mL de solución de EDTA 0.01 M, se homogeneizó con vortex, se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos y después con la ayuda de una pipeta se eliminó el sobrenadante, este paso se hizo para eliminar el exopolisacárido. A continuación, se le agregaron 150 µL de solución 1 (Sacarosa 0.3 M, Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 25 mM pH=8) y RNAsa (0.1 mg/µL) +lisozima (10 mg/mL) por muestra. Posteriormente se resuspendió con vórtex y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Se agregaron 300 µL de solución 2 (150 µL de NaOH 0.4 N y 150 µL de SDS 2%). Se invirtió el tubo suavemente hasta que se tornó claro y se incubó en hielo durante 5 minutos . Se añadieron 420 µL de solución 3 (Acetato de potasio 5 M), el tubo se invirtió cinco veces y se incubó en hielo durante 20 minutos, después se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se recuperó el sobrenadante y se añadieron 400 µL Fenol-Cloroformo-Isoamílico (24:24:2). Se volvió a invertir el tubo suavemente 70 veces y se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo limpio y se adicionaron 400 µL de Cloroformo-Isoamílico (24:1), se invirtió el tubo 110 veces y se centrifugó 12,000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo y se le agregó etanol absoluto hasta alcanzar un volumen de 1.5 mL , se dejó reposar toda la noche a -20°C. Al siguiente día se centrifugó 12,000 r.p.m. por 15 minutos y se decantó el alcohol. Se le adicionaron 800 µL de etanol al 70% (frío) y se centrifugó nuevamente 12,000 r.p.m. / 5 minutos. Se decantó el alcohol y se dejó secar la pastilla en la estufa a 37°C. Finalmente se hidrató con 50 µL de agua inyectable estéril y se conservó a -20°C.

La electroforesis se hizo mezclando 5 µL del ADN plasmídico con 1 µL de buffer de carga, se depositó la mezcla en un gel de agarosa al 0.7 % 100 V / 50 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

(Invitrogen). Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (BET) (0.5 g/L) durante un minuto y lavados por 5-10 minutos en agua destilada y se visualizaron en un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

6.12 Detección por *Southern blot* de *bla*_{NDM-1} en los plásmidos de la cepa *A. haemolyticus* AN54

Se partió de un un gel de electroforesis con ADN plasmídico obtenido mediante la técnica PFGE-S1 (Gómez, 2017). El gel se tiñó con BET y se digitalizó junto con una regla para facilitar la lectura de las bandas al final de la técnica. Posteriormente, el gel se trató con una solución desnaturalizante y una neutralizante, manteniéndolo en agitación con los siguientes lavados:

1. Depurinización: dos lavados con HCl 0.25 M por 15 minutos cada uno
2. Desnaturalización: dos lavados con NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M durante 20 minutos cada uno.
3. Neutralización: dos lavados con TRIS 0.5 M, NaCl 1.5M durante 30 minutos cada uno.

- **Transferencia**

Se colocaron en un recipiente de vidrio aproximadamente 400 mL de solución de citrato de sodio salino (SSC) 10X, posteriormente se colocó una placa de vidrio y un puente de papel filtro que se humedeció por capilaridad de ambos extremos en la solución SSC 10X y se aisló en las orillas con Parafilm. El gel se colocó encima del papel filtro tratando de evitar la formación de burbujas (con ayuda de una pipeta de vidrio), encima del gel se colocó la membrana de nylon teniendo en cuenta que el tamaño de la membrana fuera ligeramente superior al tamaño del gel para asegurar que lo cubriera totalmente. Encima de la membrana se colocó otro papel filtro y luego varias capas de papel absorbente del mismo tamaño del gel y en la parte superior se colocó un peso nivelado para que se llevara a cabo la transferencia, la cual se dejó toda la noche a temperatura ambiente, cambiando constantemente el papel absorbente (**Figura 1**).

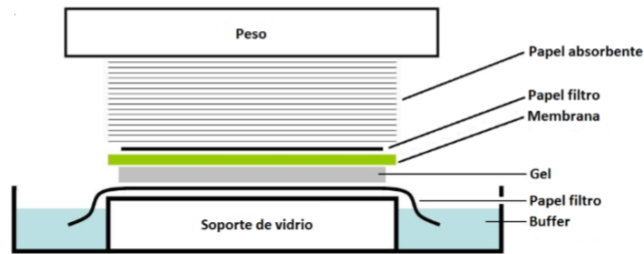


Figura 1. Montaje de transferencia *Southern blot*. Tomada de Cortés, 2016

- **Fijación de la membrana**

Una vez llevada a cabo la transferencia, se desmontó la membrana de nylon, se colocó en una superficie limpia de vidrio y se fijó con luz ultravioleta (*cross linking*) por ambos lados. Para el control positivo se usaron 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del ADN (*bla_{NDM-1}*) y se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, posteriormente se colocaron 5 μL de cada dilución en un trozo pequeño de membrana y finalmente se fijaron con luz ultravioleta al igual que la membrana transferida.

- **Marcaje de la sonda**

Este procedimiento se puede hacer el mismo día del montaje de transferencia para que esté listo el día que se lleve a cabo la hibridación. Para esto se amplificó y purificó el gen *bla_{NDM-1}*, posteriormente se marcó con peroxidasa minutos antes de hibridar. Primero, se tomó 1 μL de ADN del producto de PCR amplificado y purificado (Zymoclean™ Gel ADN Recovery Kit™, Zymo Research) en un tubo eppendorf, se aforó a 16 μL de volumen final con agua destilada. Esta mezcla se colocó en un tubo a 95°C durante 10 minutos. Posteriormente se enfrió en hielo por 5 minutos y se llevó al fondo del tubo con un spin. Se adicionaron sin agitar 4 μL de *Labelling reagent*, se mezcló, se dio un spin y se dejó toda la noche a 37° C.

Una vez pasado este tiempo el tubo se sacó de incubación y se colocó a 65° C por 10 minutos para desnaturalizar la sonda y favorecer la hibridación, la reacción se debe detener inmediatamente en hielo.

- **Pre-hibridación**

Una vez que se tuvieron fijadas las membranas, se humedecieron un poco con agua para hacerlas maleables y se colocaron en un tubo de vidrio del horno de hibridación. Se les agregó la solución de pre-hibridación previamente agitada a 37°C, que contenía el kit “DIG High Prime ADN Labeling and Detection Starter”, agregando 10 mL por cada 100 cm² de membrana y se dejaron 4 horas en el horno, en rotación y a la temperatura de hibridación. En cada paso de la técnica se trabajó el control positivo a la par de la muestra problema.

- **Hibridación**

Transcurrido el tiempo se retiró la solución de pre-hibridación (se puede reutilizar) y se preparó una solución que consistió en 3 mL por cada 100 cm² de membrana de la solución de pre-hibridación para hacer un volumen final de 20 µL con la sonda marcada, se dejó toda la noche en agitación suave y a la temperatura óptima de hibridación (T_{opt}).

Cálculos para obtener T_{opt} de la sonda *bla*_{NDM-1}:

T_{opt}=T_m – 20 a 25°C, siendo T_m=49.82 + 0.41 (%G+C) – (600/I) [I = Pares de bases de la sonda]

$$T_m = 49.82 + 0.41 (61) - (600/732)$$

$$T_m = 74.01$$

T_{opt}=T_m – 20 a 25°C

$$T_{opt} = 74.01 - 20^\circ\text{C}$$

$$T_{opt} = 54.01^\circ\text{C}$$

- **Revelado**

Se retiró la solución de hibridación y se guardó para posteriores ocasiones a -4°C.

La membrana fue colocada en un recipiente y en agitación horizontal para realizar los siguientes lavados previos al proceso de revelado:

- 1) Lavar dos veces durante 5 minutos con una solución SSC 2X, 0.1% SDS

(100 mL/100 cm² de membrana).

- 2) Lavar dos veces durante 15 minutos con una solución de SSC 0.5X, 0.1% SDS (100 mL/100 cm² de membrana) a 68°C, con agitación constante (la solución se calentó previamente para que estuviera a 68°C), estos lavados se hicieron dentro del horno de hibridación para mantener la temperatura.
- 3) Añadir la solución *Washing buffer* (100 mL/100 cm² de membrana) durante 1-5 minutos en agitación.
- 4) Se incubó por 30 minutos con la solución *Blocking solution*.
- 5) La membrana se trasladó a otro recipiente limpio e incubó por 30 minutos (20 mL/100 cm² de membrana) con la solución de *Antibody solution*, previamente se adicionó el Anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP (Fragmentos Fab-conjugados a fosfatasa alcalina), a una concentración de 1:10000 (1µL por cada 10 mL de solución de bloqueo).
- 6) Se lavó dos veces con la solución (*Washing buffer*) (100 mL/100 cm² de membrana) durante 15 minutos cada uno.
- 7) Se equilibró de 2 a 5 minutos con la solución (*Detection buffer*) (20 mL/100 cm² de membrana)

Nota: los siguientes pasos se llevaron a cabo en cuarto oscuro

- 8) Dentro de un casete especial se colocaron: un acetato del tamaño de la membrana, encima de este, la membrana con la cara que contenía el ADN hacia arriba, se adicionó el sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina (CSPD) (1 mL por cada 100 cm² de membrana), se homogenizó y se cubrió con una segunda capa de acetato, se debe tener cuidado de no dejar burbujas en el interior y limpiar muy bien los acetatos para evitar manchas, posteriormente se envolvió con parafilm y se cerró el casete, se incubó por 10 minutos a 37 °C, horizontalmente, una vez transcurrido este tiempo, se abrió y se colocó una película de Rayos X, se dejó en contacto con la membrana por 30, 60, 120 y 180 minutos para elegir la mejor película.
- 9) Para revelar las películas se sumergieron durante 1 minuto en solución fijadora y por otro minuto en solución de revelado. Al término, ya con luz se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar.

6.13 Ensayos de transferencia de material genético

- **Conjugación**

Como cepas receptoras se utilizaron las cepas de *E. coli* C600^{Rif} y DH5 α ^{NA} para la obtención de transconjugantes resistentes a los antibióticos meropenem y/o ampicilina. Se sembraron las cepas donadora y receptora en placas de TSA, se incubaron por 18 horas a 37°C. Posteriormente, una colonia de cada placa se inoculó en un tubo con 3 mL de Caldo BHI por 6 horas a 37°C en agitación, a fin de que alcanzaran una turbidez de 0.5 de la escala de McFarland. Posteriormente se mezclaron 200 μ L de cultivo de la cepa donadora con 800 μ L de cultivo de la cepa receptora en un tubo con 2 mL de caldo BHI y se incubaron por 18 horas a 37°C sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron diluciones 10^{-1} a 10^{-5} de las cuales se tomaron 100 μ L y se depositaron sobre la superficie de placas con agar BHI suplementadas con concentraciones conocidas de los antibióticos de interés, que fueron rifampicina (100 μ g/mL) ó ácido Nalidixico (32 μ g/mL) combinados con meropenem (32 μ g/mL) ó ampicilina (50 μ g/mL) para poder seleccionar las cepas transconjugantes. Después se extendió el inóculo con una varilla de vidrio y se incubaron a 37°C por 24 horas, finalmente se observó el crecimiento hasta por 72 horas. Cada experimento de conjugación se realizó por triplicado.

Las concentraciones fueron establecidas con base en los valores de CMI de la cepa y a los reportados en el CLSI, 2018 para *Acinetobacter spp.*

En las placas suplementadas con rifampicina ó en su caso ácido nalidixico debían crecer tanto la cepa receptora como las transconjugantes, mientras que en las placas suplementadas con rifampicina/meropenem, rifampicina/ampicilina, ácido nalidixico/meropenem ó ácido nalidixico/ampicilina debían crecer únicamente las transconjugantes.

Una vez que se observó crecimiento en las placas se aislaron de 6 a 8 colonias probables transconjugantes al azar, se realizó una PCR de colonia del gen *uidA* (Cortés, 2016) para cerciorarse de que fueran las cepas receptoras, y se estudió su patrón de resistencia a los antibióticos para los cuales la cepa donadora presentaba

resistencia, se realizó la CMI para los mismos antibióticos de la donadora y se amplificaron los genes que estaban presentes en el plásmido de la cepa donadora.

- **Transformación**

Para esta prueba se utilizaron células electrocompetentes previamente preparadas (**Anexo 2**). Se realizó la extracción plásmidica de la cepa de interés por el método de QuickPrep y se midió la concentración del ADN plásmidico, se ajustó a 10 ng/μL. Para el experimento se mezcló en un tubo eppendorf el ADN plásmidico y las células competentes, posteriormente se colocaron en una celda especial para electroporador (Bio-Rad) previamente esterilizada con luz UV de 15-30 min. Se colocó la celda con la mezcla en el electroporador y se programó EC2 (2.5 kV por 5 mS), una vez hecha la electroporación se adicionaron a la celda 800 μL de medio SOC, se se trasvasó todo el volumen a un tubo eppendorf y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación. Transcurrido éste tiempo se sembraron con varilla de vidrio 200 μL del cultivo en placas de agar LB suplementadas con los antibióticos de selección que se usaron para la conjugación y se incubaron 37°C durante 14 horas ó hasta que hubiera crecimiento. Como control de la eficiencia de las células competentes se electroporó el plásmido PUC19 (0.1 ng/μL). De aquellas placas donde hubo crecimiento se aislaron de 6 a 8 colonias probables transformantes al azar, se realizó una PCR de colonia del gen *uidA* para cerciorarse de que fueran las cepas receptoras, y se estudió su patrón de resistencia a los antibióticos para los cuales la cepa donadora presentó resistencia, se realizó la CMI para los mismos antibióticos de la donadora y se amplificaron los genes que estaban presentes en el plásmido de la cepa donadora.

6.14 Mapeo del transposon Tn125-like en la cepa de *A. haemolyticus* AN54

Para estudiar el entorno genético de *bla*_{NDM-1} se usó la estrategia de “*primer walking*” para lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos usando como referencia la secuencia del transposon que es acarreado por el plásmido pNDM-BJ01 de *A. lwoffii* GenBank: JQ001791.1 de manera que los productos se sobrepusieran y se pudiera

obtener la secuencia completa. El esquema de la localización de los oligos se muestra en la **figura 2** y la secuencia en la **tabla 7**:

A. *Iwoffii* pNDM-BJ01
JQ001791.1

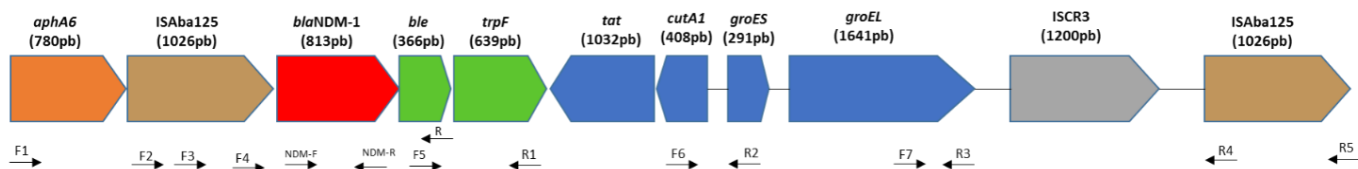


Figura 2. Localización de oligonucleótidos en el transposon Tn125 del plásmido de referencia pNDM-1-BJ01 de *A. Iwoffii*.

Tabla 7. Oligonucleótidos para mapeo del transposon Tn125

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Tm°
aphA6-F1	ATGGAATTGCCCAATATTAT	57.2
ISAbA125-F4	CTGTGCACCTCATGTTTGA	65.1
ISAbA125-F2	GGCAGAGTAAAACCTGAAGTGC	61.8
NDM-F	CGGGCCGTATGAGTGATTGC	57.8
NDM-R	CCAATATTATGCACCCGGTC	57.9
ble-F5	TGATCCGAAACCCGACTGA	68.1
cutA1-F6	TCAGTTTACCGGTCGGCTC	65.2
ISAbA125-F3	ATACCGGGTCATTGGGAAGC	66.9
ISAbA125-R4	GCAGTACGATCTCAAAGT	54.3
groEL-F7	ATCACCACCGAAGCGATGGTG	71.4
groEL-R2	GCAGCGGCTTGATATTGGACAT	69.0
groELR3	TTAGAAATCCATGCCGCCCATG	71.4
trpF-R1	TTAGGCCAAGCGCACCGCA	74.1
ble-R	TCAGTCGGGGTTCTGGATCA	68.1
ISAbA125-R5	GGCGAATTCAAACATGAGGTGC	69.6

6.15 Secuenciación Masiva de Genomas

- **Cepas de estudio**

Se realizó la secuenciación masiva del genoma de dos cepas resistentes a carbapenémicos, una fue la cepa de *A. haemolyticus* AN54 proveniente de un líquido de diálisis peritoneal y la otra fue la cepa de *A. baumannii* AN71 que fue aislada de un líquido sinovial, ambas de pacientes del Hospital para el Niño Poblano.

- **Extracción de ADN total y tecnologías de secuenciación**

Las cepas fueron inoculadas en 5 ml de caldo LB durante 24 horas a 37°C y posteriormente se realizó la extracción de ADN. En el caso de la cepa AN54, las extracciones se realizaron con los kits (para Illumina: Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific™ y para PacBio: Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit, Qiagen).

Para la cepa AN71 se siguió el protocolo del Kit de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation. Ma, USA. Posteriormente se determinó la concentración y calidad del ADN con el NanoDrop 2000® (Thermo Scientific), la pureza se determinó por el cociente entre las absorbancias 260/280 nm. Una preparación pura de ADN daría un cociente entre 1.8 y 2.0 y si hay contaminación con proteínas o algún otro compuesto el cociente es menor; se corrió 1 µL en gel de agarosa al 0.5 % y finalmente enviados a los lugares a donde fueron secuenciadas.

La cepa *A. haemolyticus* AN54 se secuenció por dos tecnologías: MiSeq Illumina 2x300 con 5 millones de lecturas pareadas que permite obtener numerosas lecturas cortas, ésta se realizó en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, IBT, UNAM, Cuernavaca, Moleros, México, y por la tecnología PacBio RSII (SMRT) Yale Center for Genome Analysis, Yale University, EUA. Este es un tipo de secuenciación en tiempo real de una única molécula de ADN, que permite obtener lecturas largas con cobertura uniforme que facilitan el ensamble de *de novo* y disminuyen el error de ensamblado debido a las múltiples secuencias repetidas que tiene *Acinetobacter*. Se usaron las lecturas de ambas tecnologías se usaron para hacer un ensamble

híbrido que permitiera abarcar la mayor longitud del cromosoma y plásmidos de la cepa.

La cepa *A. baumannii* AN71 únicamente se secuenció con la tecnología NextSeq Illumina 2x75 con 5 millones de lecturas pareadas en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, IBT, UNAM, Cuernavaca, Moleros, México.

- **Análisis bioinformático de los genomas.**

Una vez recibidas las lecturas de las cepas, se realizaron una serie de pasos para su análisis, en el caso de la cepa AN54 se hizo en colaboración con el Dr. Miguel Ángel Cevallos del Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca, Morelos. Para la cepa AN71 se realizó en el servidor del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad.

Pasos para el análisis:

1. La calidad de las lecturas se corroboró con el programa FastQC para las lecturas de Illumina y en SMTR portal para las lecturas de PacBio.
2. Los ensamblajes se realizaron correspondientes con los ensambladores: Velvet v1.2.10 (PLACNETw), SPAdes v. 3.9.0, SPAdes v. 3.11.1 y Unicycler v. 0.4.1, Metassembler v1.5.
3. La calidad de los ensamblajes se verificó con el programa Quast
4. Los genomas se anotaron con RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) v.2.0 (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>), Prokka (*rapid prokaryotic genome annotation*) v.9.1 y la cepa AN54 con *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)
5. Los genes de resistencia se buscaron con la base de datos ResFinder v.3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), The Comprehensive Antibiotic Resistance Database CARD <https://card.mcmaster.ca/>

6. Los genes de virulencia se buscaron con la base de datos Virulence Factors Database usando la herramienta en línea VFAnalyzer (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFAnalyzer>)
7. La tipificación multilocus de secuencias (en inglés *Multilocus sequence typing, MLST*) se realizó a la cepa *A. baumannii* AN71 (<https://pubmlst.org/abaumannii/>)
8. Se buscaron e identificaron integrones en la página Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>), y para las Secuencias de Inserción en ISFinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>)
9. Se utilizaron las bases de datos de referencia para Betalactamasas: <http://www.bldb.eu/>
10. Para los dibujos de plásmidos y entornos genéticos se usaron los programas Easyfig v2.2.2 y XPlasMap.

6.16 Cerrado de la secuencia del plásmido pAhaeAN54

Para completar los fragmentos que no fueron obtenidos con la secuenciación por Illumina de la cepa AN54 se diseñaron otros juegos de oligonucleótidos para tratar de cerrar el plásmido. Estos oligos se localizan alrededor de 200 pb dentro de la secuencia conocida del plásmido, para después lograr empalmarlos (**tabla 8**):

Tabla 8. Oligonucleótidos para cerrar secuencia de pAhaeAN54

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm°
pAN54-F1:	GTTGAGATTGATTCTCAATACCTACAAGC	67.9
pAN54-R1:	GAGGTCACCTAATATGAATAATGCACAGTTC	65.3
pAN54-F2:	TCAGCTAAAGCTTCATAACGATCTAAGCGG	71.3
pAN54-R2:	CGTAGAATTTTATCAAGTGGTATCTAAGAA	62.5
pAN54-F3:	AGATAGATAAAAGACTAGGAAAAGAAAAGC	61.7
pAN54-R3:	GTTTACACCAATCCAGCTATTGGCCAATTG	73.3
pAN54-F4:	AGGCCTAGTAAATAGATGATCTTAATTTGG	64.2
pAN54-R4:	TTGTAGATATATCCTTTGTTGAACGTTGCC	68.6
pAN54-F5:	CACTGTATGTGGTCTCTGTATATAAAGTGC	64.5
pAN54-R5:	AATAGCTTACGTTGATCTGCGTCATA GTG	71.6

6.17 Clonación de fragmentos del plásmido pAhaeAN54e

Para completar los fragmentos faltantes del plásmido que acarrea *bla*_{N_{DM}-1}, se diseñaron oligonucleótidos de mayor longitud y especificidad para después clonar los fragmentos en vectores que nos permitieran obtener la mayor cantidad de nucleótidos que empalmarán con la secuencia conocida, y así cerrar la molécula.

Para las clonaciones, primero se diseñaron oligonucleótidos específicos (**tabla 9**), se realizaron las reacciones de PCR de los fragmentos faltantes del plásmido de estudio y posteriormente se clonaron siguiendo el protocolo blunt en el vector pJET1.2/Blunt (CloneJET PCR Cloning Kit). Se dejaron incubando toda la noche a 12°C. Posteriormente se transformaron en células competentes *E. coli* DH5α, la selección se hizo en placas de agar LB suplementadas con 100µg/mL de Ampicilina, se incubaron a 37°C/14horas, se realizó una selección al azar de 6 colonias y se hizo extracción de plásmidos por lisis alcalina (**Anexo 3**). Para verificar los insertos se sometieron a restricción 4 horas con las enzimas *Bgl**III* y *Xba**I* (BioLabs Inc, New England).

Tabla 9. Oligonucleotidos para clonar fragmentos del plásmido pAhaeAN54e

Rx/ Fragmento teórico	Amplicón esperado	Primer	5'-3'	Tm
1.- (1168pb)	2878pb	R ₁ :	GAGGTCACATAATGAATAATGCACAGTTC	66.7
2.- (763pb)	1300pb	F ₂ :	TCAGCTAAAGCTTCATAACGATCTAAGCGG	69.2
		R ₂ :	CGTAGAATTTTATCAAGTGGTATCTAAGAA	63.9
3.- (1109pb)	1689pb	F ₃ :	AGATAGATAAAAGACTAGGAAAAGAAAAGC	63.9
		R ₃ :	GTTTACACCAATCCAGCTATTGGCCAATTG	69.2
4.- (800pb)	1372pb	F ₄ :	AGGCCTAGTAAATAGATGATCTTAATTTGG	65.1
		R ₄ :	TTGTAGATATATCCTTTGTTGAACGTTGCC	66.7
5.- (1058pb)	1703pb	F ₅ :	CACTGTATGTGGTCTCTGTATATAAAGTGC	68
		R ₅ :	CACTATGACGCAGATCAACGTGAAGCTATT	69.2
6.- (1225pb)	2878pb	F ₁ :	GTTGAGATTGATTCCTCAATACCTACAAGC	68

7. RESULTADOS

Debido a que se recibieron cepas de dos hospitales del estado de Puebla, los resultados se muestran individualmente para cada uno de ellos para su mayor comprensión.

7.1 Hospital para el Niño Poblano (HNP)

7.1.1 Procedencia de las cepas

El Hospital para el Niño Poblano es un nosocomio catalogado de tercer nivel, atiende a pacientes pediátricos de 0-18 años, principalmente del estado de Puebla y en algunas ocasiones de otros estados vecinos.

De este hospital se recolectaron 75 cepas del periodo 2009-2018 de las cuales no se recuperaron 8, por lo que se trabajaron un total de 67, a las que se corroboró su pureza y fueron criopreservadas en el cepario del laboratorio a -70°C .

Provinieron en su mayoría de líquido de diálisis y secreciones diversas, de los servicios de Medicina Interna y Urgencias (**Gráficos 1 y 2**).

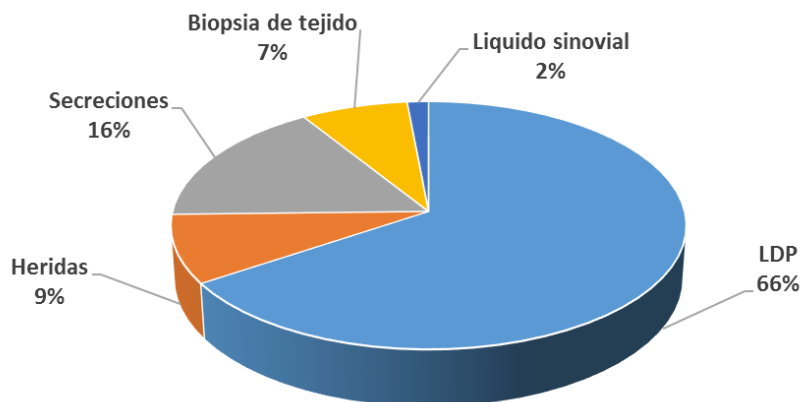


Gráfico 1. Porcentaje de cepas de *Acinetobacter* spp. por origen de la muestra, n=67.

LDP: Líquido de diálisis peritoneal.

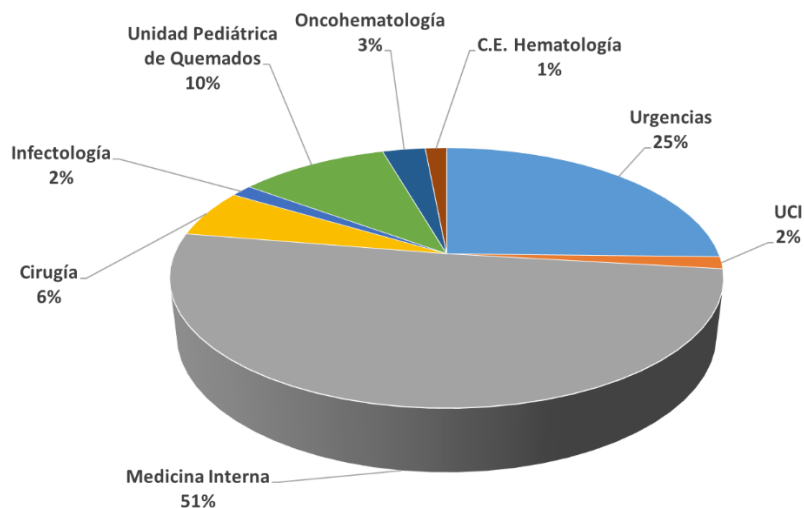


Gráfico 2. Porcentaje de cepas de *Acinetobacter* spp. por servicio hospitalario, n=67.

C.E. Consulta externa, **UCI:** Unidad de cuidados intensivos.

7.1.2 Fenotipo de resistencia de las cepas *Acinetobacter* spp. del HNP

En el **gráfico 3** se muestra el perfil de resistencia que presentaron las cepas de *Acinetobacter* spp., se aprecia que más del 50% de las cepas fueron sensibles; sin embargo, se encontraron cepas con resistencia intermedia principalmente a las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftriaxona. El 12% de las cepas fue resistente a carbapenémicos, 21% a amikacina y en menor porcentaje a quinolonas.

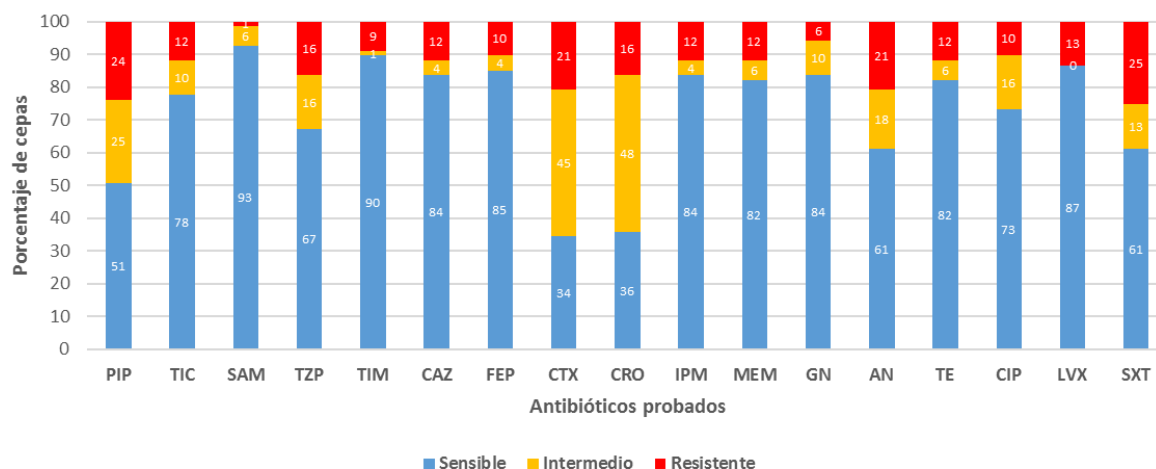


Gráfico 3. Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las 67 cepas de *Acinetobacter* spp. aisladas del Hospital para el Niño Poblano. PIP: Piperacilina, TIC: Ticarcilina, SAM: Ampicilina/Sulbactam, TZP: Piperacilina/Tazobactam, TIM: Ticarcilina/Ác. Clavulánico, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, GN: Gentamicina, AN: Amikacina, TE: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol, CLSI, 2018.

7.1.3 Tipificación molecular por *rpoB* de las cepas aisladas del HNP

Para la tipificación molecular se seleccionaron 60 cepas en base a su perfil de resistencia a antibióticos. Las cepas fueron previamente identificadas fenotípicamente en el hospital por el sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux) y en el LMHyC se realizó la tipificación molecular por secuenciación parcial del gen *rpoB*, posteriormente se generó el dendograma.

De este análisis se obtuvieron 30 *A. haemolyticus*, 23 del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* (Acb) y una cepa de cada una de las siguientes especies: *A. oleivorans*, *A. venetianus*, *A. grimontii*, *A. indicus*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. ursingii*. (Figura 3).

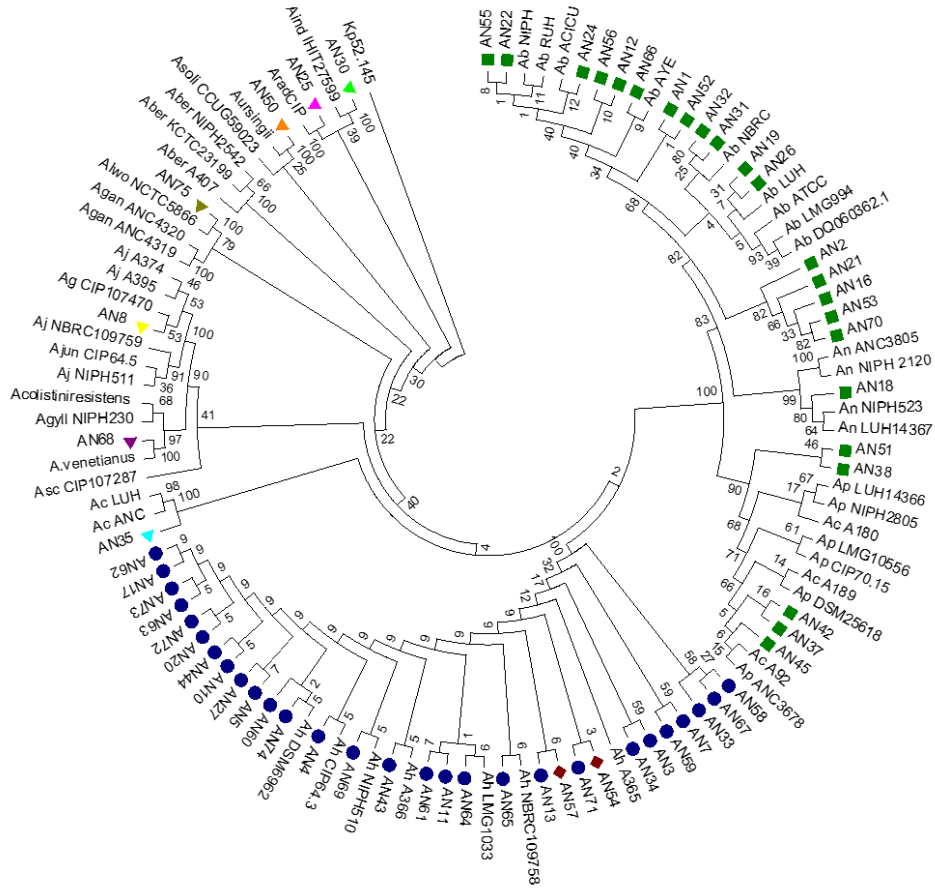


Figura 3. Dendrograma que representa la relación filogenética de las 60 cepas de *Acinetobacter* spp. tipificadas del HNP, derivado de la secuencia parcial del gen *rpoB* ≈350pb. Método UPGMA p-distance 100 repeticiones con MEGA7 software. Los cuadros verdes son especies del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, círculos azules y marrones: *A. haemolyticus*, triángulos de colores otras especies de *Acinetobacter* identificadas. **Ah: *A. haemolyticus*, **Asc:** *A. schindleri*, **Agyll:** *A. gyllenbergii*, **Aj:** *A. junnii*, **Ajun:** *A. junnii*, **Ag:** *A. grimontii*, **Ac:** *A. calcoaceticus*, **Ap:** *A. pittii*, **Ab:** *A. baumannii*, **Aber:** *A. bereziniae*, **Aind:** *A. indicus*, **Alwo:** *A. lwoffii*, **Agan:** *A. gandensis*, **Asoli:** *A. soli*, **Kp:** *Klebsiella pneumoniae*.**

7.2 Estudio de la resistencia en las diversas especies de *Acinetobacter*

Para el estudio de la resistencia, las cepas fueron separadas de acuerdo con la especie a la que pertenecían, los resultados se muestran en los siguientes apartados.

7.2.1 Fenotipo de resistencia de las cepas de *A. haemolyticus*

En el **gráfico 4** se muestra el perfil de resistencia por Kirby-Bauer de las 30 cepas tipificadas como *A. haemolyticus*. En general presentaron sensibilidad a la mayoría de los antibióticos probados. Se aprecia que menos de la mitad de las cepas fueron intermedias a cefotaxima, ceftriaxona, y tres cepas fueron resistentes a imipenem y meropenem. Amikacina fue el aminoglucósido en el que se encontró más número de cepas resistentes e intermedias se detectaron.

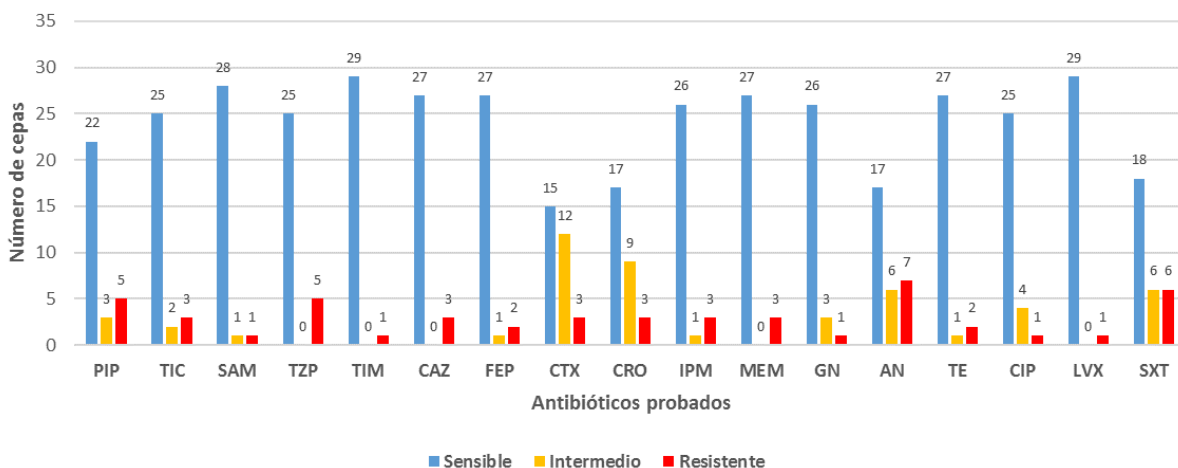


Gráfico 4. Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las 30 cepas de *Acinetobacter haemolyticus* aisladas del Hospital para el Niño Poblano. PIP: Piperacilina, TIC: Ticarcilina, SAM: Ampicilina/Sulbactam, TZP: Piperacilina/Tazobactam, TIM: Ticarcilina/Ác. Clavulánico, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, GN: Gentamicina, AN: Amikacina, TE: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol, CLSI, 2018.

El método de concentración mínima inhibitoria (CMI) permite obtener resultados cuantitativos para predecir el comportamiento de un antibiótico sobre una cepa en el paciente. Con esta metodología se obtuvo que un bajo número de cepas de *A. haemolyticus* mostraron resistencia a cefalosporinas, carbapenémicos y ciprofloxacino, sin embargo, más de la mitad fueron resistentes a amikacina (**Gráfico 5**).

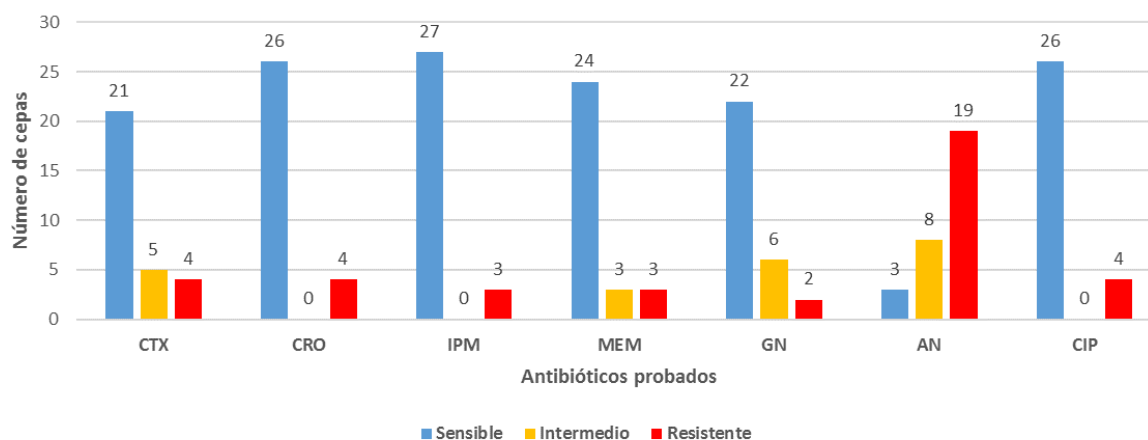


Gráfico 5. Perfil de sensibilidad por Concentración Mínima Inhibitoria de los 30 de *A. haemolyticus* aislados del Hospital para el Niño Poblano. CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, GN: Gentamicina, AN: Amikacina, CIP: Ciprofloxacino, CLSI, 2018.

7.2.2 Fenotipo de resistencia a antibióticos de las cepas del complejo *A. calcoaceticus-baumannii*

Los aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* exhibieron mayor resistencia a los betalactámicos de primera línea, así como a los combinados con inhibidores de betalactamasas, a cefalosporinas y carbapenémicos, en comparación con las cepas *A. haemolyticus*, además, se observó que por lo menos seis cepas fueron resistentes a amikacina, a quinolonas y a trimetoprim-sulfametoxazol (**Gráfico 6**).

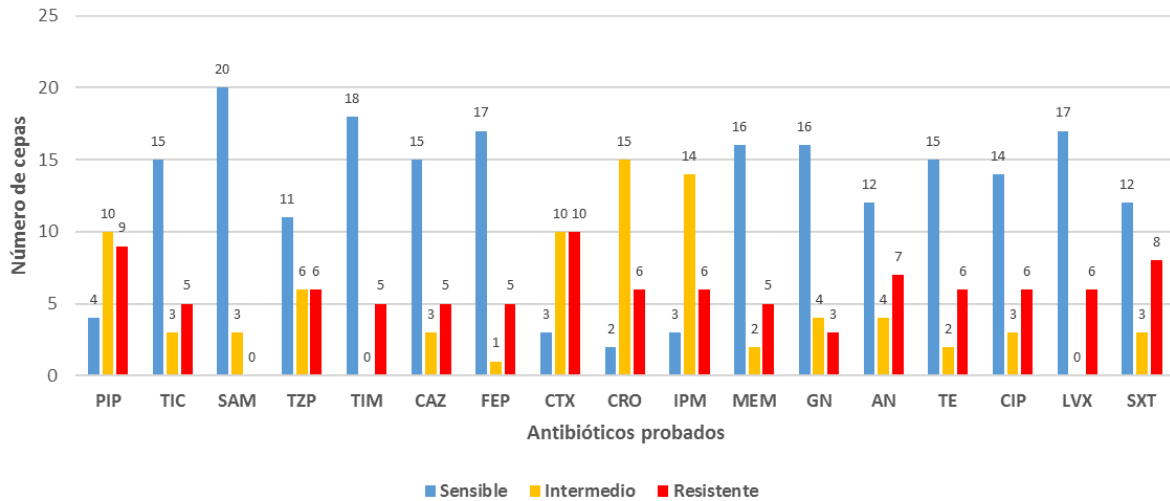


Gráfico 6. Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de 23 cepas del del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* aisladas del Hospital para el Niño Poblano. PIP: Piperacilina, **TIC:** Ticarcilina, **SAM:** Ampicilina/Sulbactam, **TZP:** Piperacilina/Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina/Ác. Clavulánico, **CAZ:** Ceftazidima, **FEP:** Cefepime, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona, **IPM:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **GN:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **TE:** Tetraciclina, **CIP:** Ciprofloxacino, **LVX:** Levofloxacino, **SXT:** Trimetoprim/Sulfametoxazol, **CLSI, 2018.**

7.2.3 Fenotipo de resistencia a antibióticos de las cepas de diferentes especies de *Acinetobacter* encontradas

En cuanto al perfil de la resistencia de las otras especies consideradas ambientales, en el **gráfico 7** se muestran los resultados, el cual observa que fueron más sensibles respecto a las cepas del complejo *Acb* y *A. haemolyticus*.

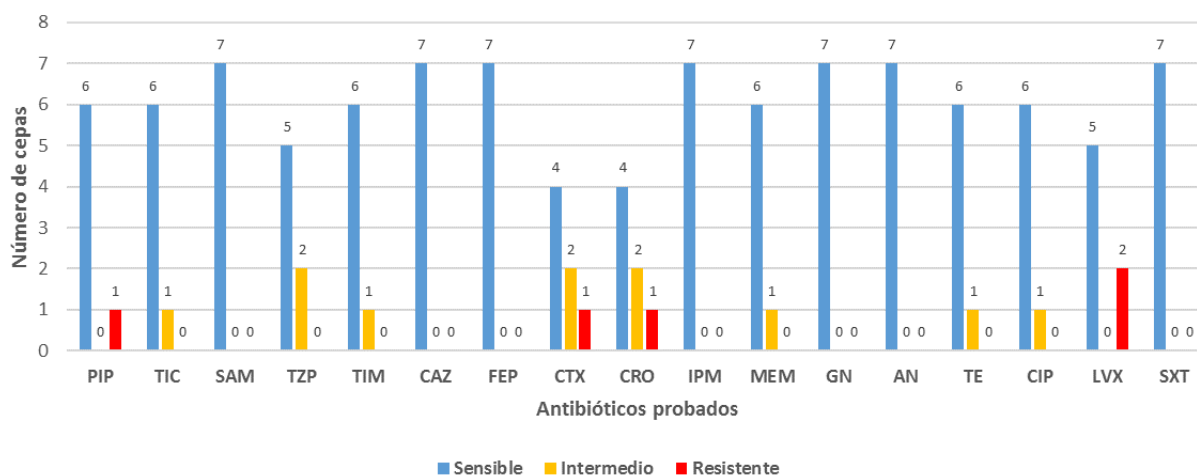


Gráfico 7. Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las 7 cepas de las otras especies de *Acinetobacter* del Hospital para el Niño Poblano. PIP: Piperacilina, TIC: Ticarcilina, SAM: Ampicilina/Sulbactam, TZP: Piperacilina/Tazobactam, TIM: Ticarcilina/Ác. Clavulánico, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, GN: Gentamicina, AN: Amikacina, TE: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol. CLSI, 2018.

7.3 Relación clonal de las cepas de *Acinetobacter*

7.3.1 Relación clonal de las cepas de *A. haemolyticus*

El análisis de la relación clonal mostró que las cepas AN33, AN34, AN58 y AN69 no fueron tipificables bajo estas condiciones de *PFGE*, y en 6 cepas no se realizó el análisis debido a problemas técnicos. En las 20 cepas restantes se detectaron 20 pulsotipos distintos, con un coeficiente de Dice ≤ 80 por lo que no presentaron relación genética (Figura 4).

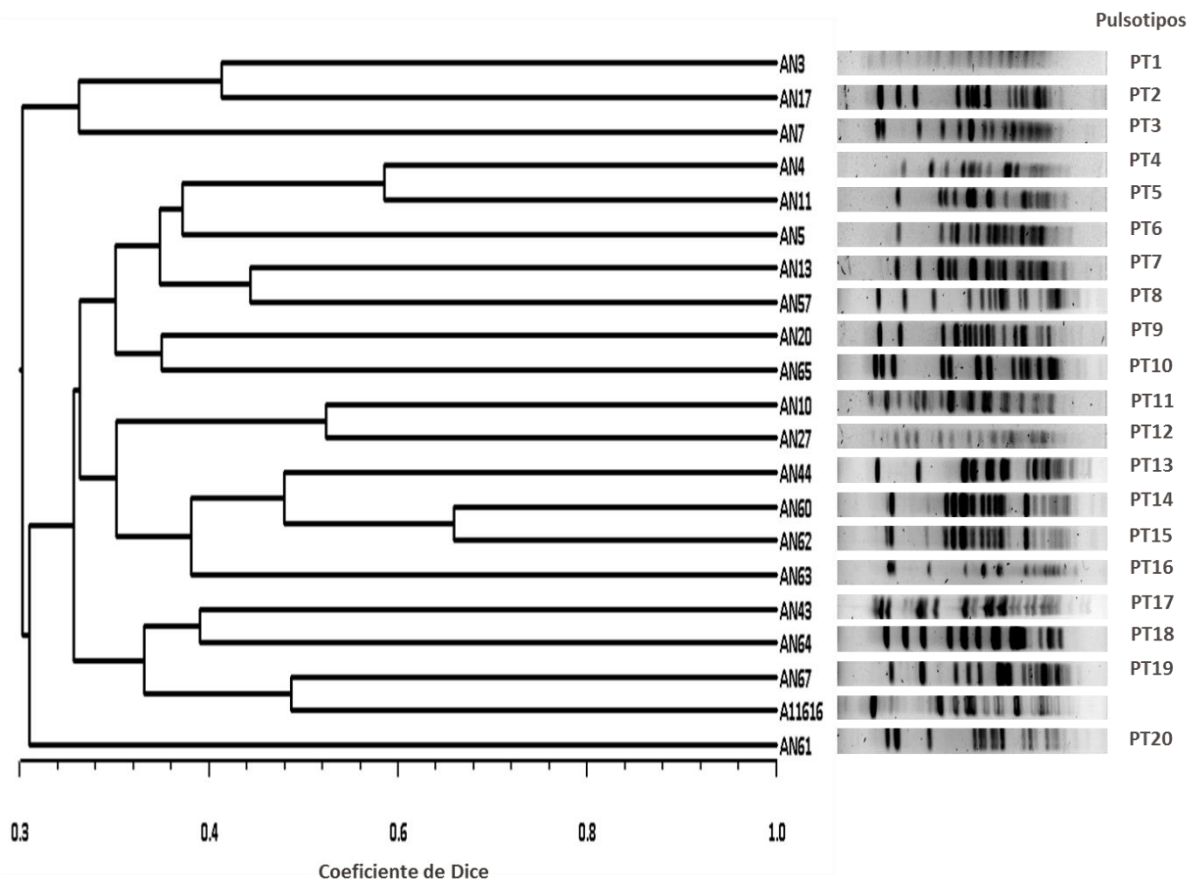


Figura 4. Dendrograma obtenido por PFGE de las 20 cepas de *A. haemolyticus*. Los aislados muestran un coeficiente de Dice ≤ 0.80 (≈ 65) lo que indica que no están genéticamente relacionadas. **A11616:** Cepa control *A. haemolyticus*. **PT:** Pulsotipos.

7.3.2 Relación clonal de las cepas *A. baumannii*-resistentes a carbapenémicos.

En el caso de las cepas de *A. baumannii* la relación clonal se estudió en las 5 cepas resistentes a carbapenémicos la unidad pediátrica de quemados del hospital. Cuatro de ellas fueron genéticamente relacionadas, indicando que posiblemente la misma cepa estuvo circulando en esa área específicamente (**Figura 5**).

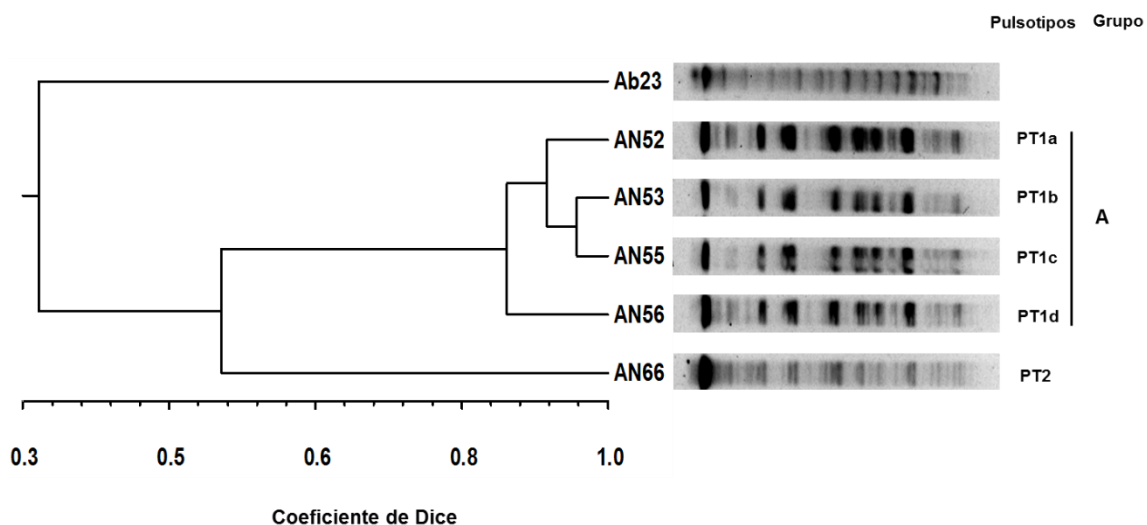


Figura 5. Dendrograma obtenido por *PFGE* de las 5 cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos provenientes de la Unidad Pediátrica de Quemados. Ab23: Cepa control *A. baumannii*, PT: Pulsotipos.

7.4 Genotipo de resistencia a antibióticos de las cepas de *A. haemolyticus*

Para continuar el estudio, se determinó el genotipo de resistencia a antibióticos de las 24 cepas de *A. haemolyticus* que fueron sometidas a *PFGE*, incluyendo aquellas que no fueron tipificables bajo las condiciones empleadas.

7.4.1 Genotipo de resistencia a betalactámicos de las cepas de *A. haemolyticus*

El genotipo de resistencia de las cepas de las 24 cepas de *A. haemolyticus* se realizó por PCR con oligonucleótidos diseñados en este estudio, y mediante en análisis de datos de la secuenciación masiva del genoma de 13 de estas cepas, como parte de un proyecto de colaboración con el Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Campus Morelos. En el **gráfico 8** se muestran los genes que se encontraron en las cepas por ambas metodologías.

De las cuales, el 17% de las cepas presentaron el *bla*_{OXA-214}-like truncado, el 29% de las cepas fueron portadoras de *bla*_{OXA-214}, 4% *bla*_{OXA-215}, 8% *bla*_{OXA-264}, 29% *bla*_{OXA-265} y el 13% *bla*_{OXA-575}.

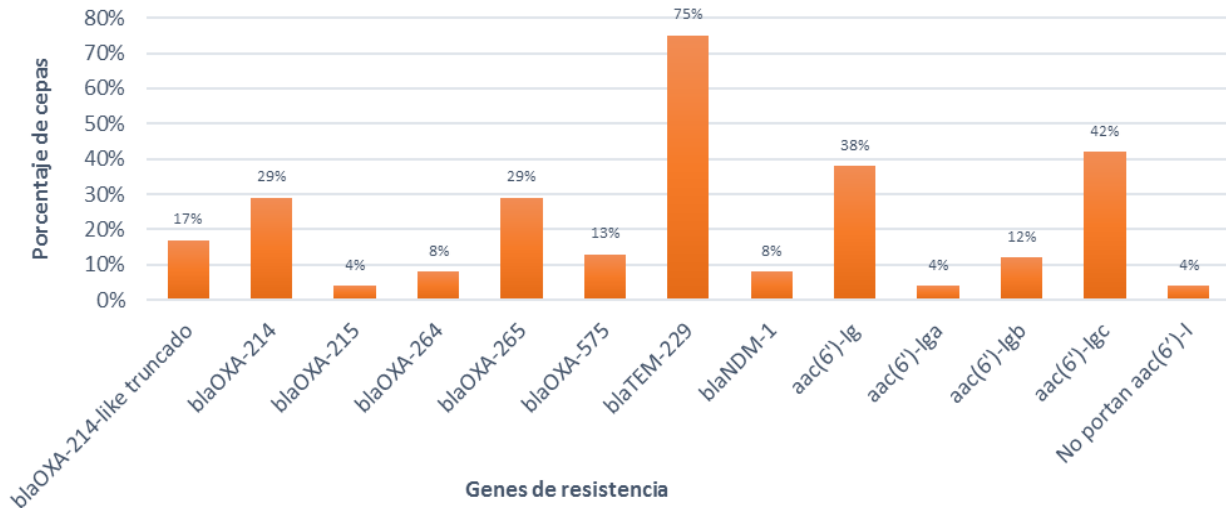


Gráfico 8. Porcentaje de genes de resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos encontrados en las 24 cepas de *A. haemolyticus*.

Se determinó que OXA-575 era una nueva variante de la familia *bla*_{OXA-214} debido a los análisis de secuencias de aminoácidos que se ilustran en el dendograma de la **figura 6**; esta nueva enzima presenta el 97.82% de identidad con respecto a OXA-214 y 97.45% con las otras variantes de la familia OXA-214 (OXA-215, OXA-264 y OXA-265) (**Anexo 4**). Esta nueva variante fue depositada en la base de datos del GenBank con el número de acceso: MG821355.1.

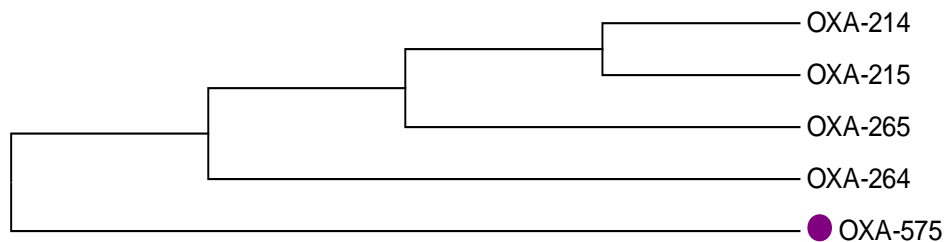


Figura 6. Dendograma que representa las diferencias entre las variantes de la familia OXA-214 en las cepas de *A. haemolyticus*. Método UPGMA 100 repeticiones con MEGA7 software.

Con la finalidad de saber si las mutaciones aminoacídicas encontradas (T8I, K74R, Q189R, P195Q, K196D, Q199K) conferirían algún cambio conformacional en la nueva proteína con respecto a OXA-214, se realizó el modelo tridimensional *in silico*, en el cual se aprecia que el sitio activo no sufrió ningún cambio aparente (**Figura 7**).

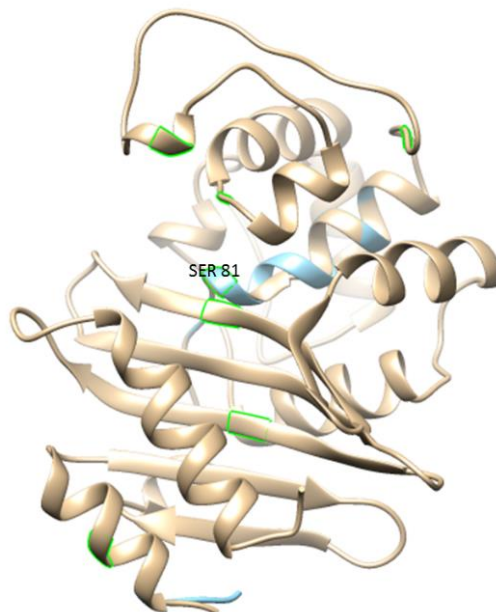


Figura 7. Modelo *in-silico* de las proteínas OXA-575 (paja) y OXA-214 (azul). Realizado con Pyre2 v2.0 y Chimera v1.12. La proteína OXA-575 presentó los siguientes cambios aminoacídicos: T8I, K74R, Q189R, P195Q, K196D, Q199K.

Interesantemente, solo una de las tres cepas que portan la nueva variante (AN3), mostró una concentración mínima inhibitoria alta para las cefalosporinas CTX y CRO.

Para el análisis del entorno genético de los genes codificantes de estas betalactamasas se usaron los datos de la secuenciación masiva de las cepas estudiadas, se realizaron alineamientos de los entornos y también se tomaron algunas secuencias depositadas en el GenBank. En la **figura 8** se muestra el arreglo que se encontró en este trabajo en todas las cepas, donde río arriba de la betalactamasa hay una proteína de membrana de 33-36kDa y río abajo se encuentra una proteína con dominio GGDEF.



Figura 8. Entorno genético de las betalactamasas OXA-214-like en *A. haemolyticus*

Además, tres cepas portaron *bla*_{OXA-265} truncado por la secuencia de inserción IS*Aba125* en el nucleótido 106 y una cepa tuvo un codón de paro prematuro en el aminoácido 253; en estas cepas no hay cambios en la CMI para betalactámicos con respecto a las otras cepas que tienen el gen íntegro (**Figura 9, Tabla 10**).

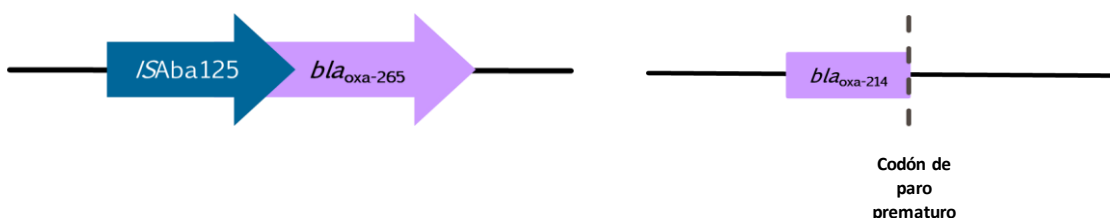


Figura 9. Representación de alteraciones en las betalactamasas OXA-214-like. Las cepas AN7, AN20 y AN64 tuvieron el gen truncado y la cepa AN43 el codón de paro prematuro.

Por otro lado, el 75% de las cepas albergan *bla*_{TEM-229}, que también es una nueva variante encontrada en este trabajo, cuyo número de acceso asignado en el GenBank fue MG821356.1. El 4% presentó delección de 78 aminoácidos a partir de la posición 209 y finalmente el 21% de las cepas no portaron el gen que codifica para esta betalactamasa.

El análisis con *Blast* de la nueva variante TEM-229 mostró que tiene 99.65% de identidad con TEM-116 a nivel de aminoácidos, debido a la mutación I256V. El dendograma construido se aprecia en la **figura 10. (Anexo 5)**.

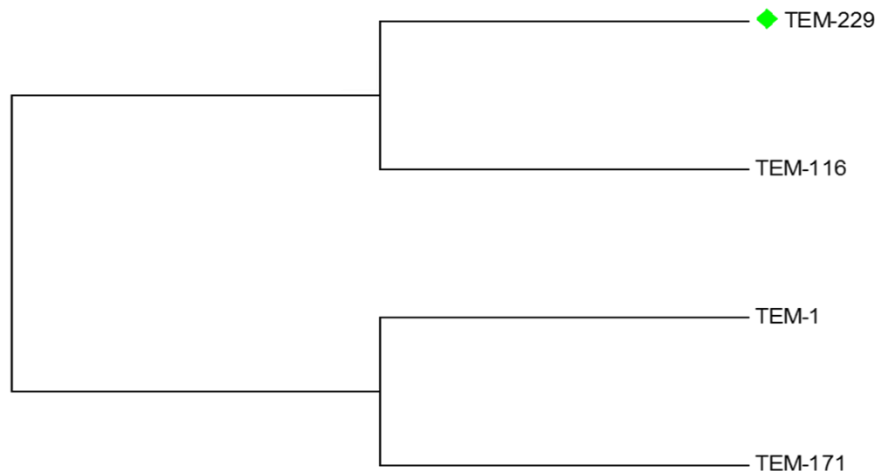


Figura 10. Dendrograma que representa las diferencias entre las variantes TEM-229, TEM-116, TEM-1 y TEM-171. Método UPGMA 100 repeticiones con MEGA7 software.

Es importante destacar que se detectaron dos cepas AN54 y AN57 que fueron aisladas del mismo paciente en diferente periodo de tiempo y que fueron resistentes a cefalosporinas, carbapenémicos y que portaban *bla*_{OXA-265} y *bla*_{NDM-1} (**Tabla 12**).

7.4.2 Genotipo de resistencia a aminoglucósidos de las cepas *A. haemolyticus*

En cuanto al fenotipo de resistencia a aminoglucósidos, se evidenció que las cepas fueron intermedias y resistentes a gentamicina y amikacina. Donde el 38% (9) de las cepas portaban *aac(6')-I_g*, el 4% (1) porta la variante *aac(6')-I_{ga}*, 12% (3) *aac(6')-I_{gb}* y 42% (10) *aac(6')-I_{gc}*, siendo las tres últimas, nuevas variantes, que fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso MK468739, MK468740 y MK468738 respectivamente. Finalmente, el 4% (1) de las cepas no portó ninguna variante de esta familia enzimas modificadoras de aminoglucósidos. En la **figura 11** se muestra la diversidad de la familia AAC(6')-I.

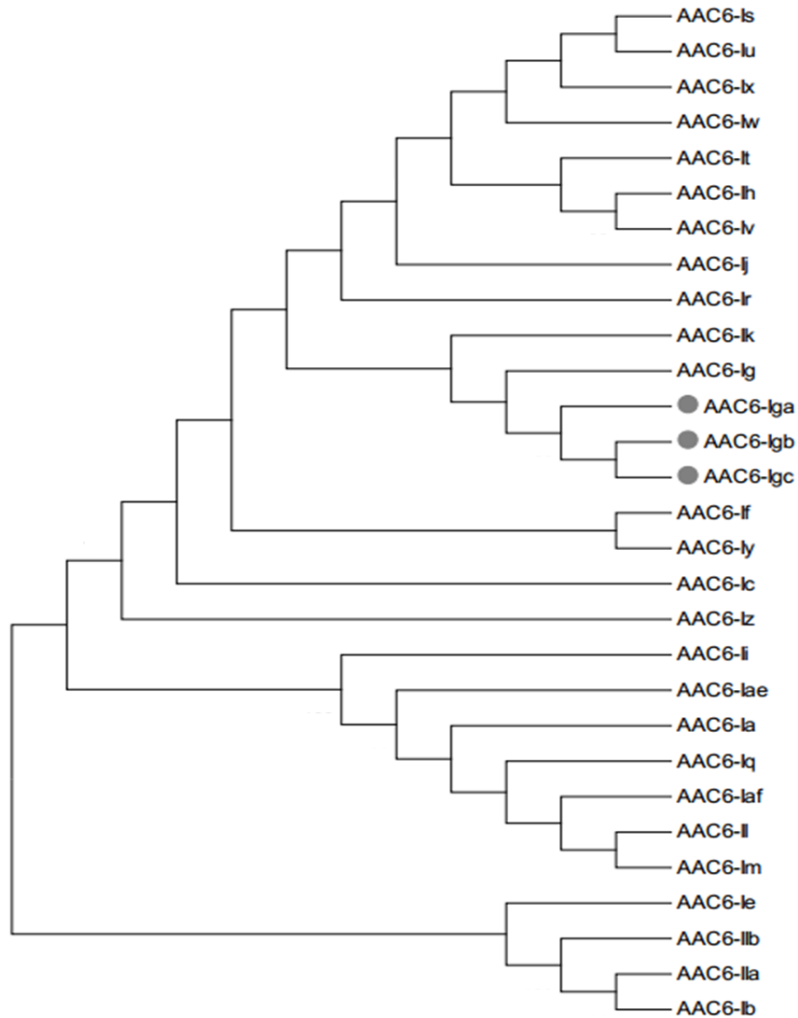


Figura 11. Dendrograma que muestra variantes alélicas de la familia AAC(6')-I (aminoglucósidos 6'-N-acetiltransferasas). El alineamiento se hizo con Clustal Omega y el árbol fue generado por el software MEGA 7 utilizando UPGMA y el método de número de diferencias. Números de acceso de las secuencias utilizadas: AAC(6')-Ic (AAA26549.1), AAC(6')-If (X55353), AAC(6')-Ilg (L09246), AAC(6')-Ih (L29044), AAC(6')-Ij (L29045), AAC(6')-Ik (L29510), AAC(6')-Il (Z54241), AAC(6')-Ir (AF031326), AAC(6')-Is (AF031327), AAC(6')-It (AF031328), AAC(6')-Iu (AF031329), AAC(6')-Iv (AF031330), AAC(6')-Iw (AF031331), AAC(6')-Ix (AF031332), AAC(6')-Iy (AF144880), AAC(6')-Iz (AF140221), AAC(6)-IIa (M29695), AAC(6)-IIb (L06163), AAC(6)-Ia (M18967), AAC(6)-Ib (M55547), AAC(6)-Ie (M13771), AAC(6)-Ii (L12710), AAC(6)-Im (Z54241), AAC(6)-Iq (AF047556), AAC(6)-Iaf (AB462903), AAC(6)-Iae (BAD14386). Con círculos en gris se señalan las nuevas variantes encontradas en este trabajo.

7.4.3 Genotipo de resistencia a quinolonas de las cepas de *A. haemolyticus*

Con el objetivo de estudiar si había alguna relación entre la resistencia a quinolonas y la presencia de mutaciones en GyrA y ParC, se eligieron las cepas AN3, AN4 resistentes a CIP y la cepa AN7 sensible a CIP.

La proteína GyrA de las cepas AN3 y AN4 de *A. haemolyticus* tuvo un 93.45% de identidad con la homóloga en *A. baumannii* (GenBank: X82165.1). En las tres cepas analizadas no se encontraron los cambios aminoacídicos (Ser80Leu, Gly81Val, Ala84Pro, Gly81Asp) en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR por sus siglas en inglés) que han sido reportados en *A. baumannii* (GenBank: X82165.1). Al hacer el análisis de la proteína completa se encontraron mutaciones en otras regiones, así como la inserción de 7 aminoácidos en la posición 896 con respecto a la proteína GyrA de la clona global *A. baumannii* ACICU (GenBank: CP000863.1) (**Anexo 6**).

Curiosamente GyrA de las cepas AN3 (Resistente a CIP >64µg/mL) y AN7 (Sensible a CIP <0.5µg/mL) exhibieron un 100% de identidad; sin embargo, las cepas AN3 y AN4 (Resistentes a CIP 8 µg/mL) mostraron solo un 93.74%.

Algo similar sucedió en el caso de ParC, donde se observó un 90.53% de identidad con respecto a la homóloga de *A. baumannii* ACICU (GenBank: CP000863.1); no se encontraron las mutaciones reportadas en *A. baumannii* (GenBank: X95819.1) (Ser80Leu, Glu84Lys, Gly78Cys), pero se detectaron otras a lo largo de la proteína ParC de las cepas de *A. haemolyticus* (**Anexo 7**).

Las cepas AN3 y AN7 fueron 100% idénticas, mientras que AN3 con AN4 únicamente presentaron un 99.32% de identidad.

Estos resultados sugieren que se requieren estudios más detallados para saber la relación entre las mutaciones en GyrA y ParC y la resistencia a quinolonas en otras especies de *Acinetobacter*.

7.5 Genotipo de resistencia a antibióticos de las cepas de *A. baumannii*

7.5.1 Genotipo de resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos de las cepas *A. baumannii*.

De las 23 cepas que fueron tipificadas dentro del complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, se seleccionaron aquellas que mostraron resistencia a los carbapenémicos, entre otros antibióticos probados, de las cuales 5 cepas cumplieron estas características, por lo que se les buscaron diversos genes de resistencia que codifican para BLEEs, Metalo-beta-lactamasas y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos de la familia AAC(6')-I. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la **tabla 11**, en la cual se aprecia que el 100% de las cepas resistentes a carbapenémicos portaron *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23}. Cabe mencionar que no se encontró la secuencia *ISAba1* río arriba de *bla*_{OXA-23}.

7.6 Participación de bombas de expulsión en la resistencia a cefotaxima, meropenem, amikacina y ciprofloxacino en las cepas de *A. haemolyticus* y *A. baumannii*

Para determinar el papel de las bombas de expulsión en el fenotipo de resistencia a betalactámicos, se seleccionaron 6 cepas de *A. haemolyticus* resistentes e intermedias a cefotaxima. Realizamos CMI para CTX en presencia y ausencia de EPI (25 mg/L), observando que tres cepas de *A. haemolyticus* mostraron una disminución de 2 veces en el valor de la CMI (AN3, AN11 y AN69), una cepa disminuyó en el orden de 4 veces (AN44), y hubo una disminución de 6 veces en otra cepa (AN27). Por otro lado, la cepa de *A. haemolyticus* (AN57), que porta *bla*_{OXA-265} y *bla*_{NDM-1}, no mostró decremento en la CMI (**Tabla 10**).

En 22 cepas de *A. haemolyticus* se determinó la CMI para AN en presencia y ausencia de EPI. Los resultados mostraron que en cinco cepas la CMI disminuyó 4 veces (AN4, AN27, AN34, AN43, AN62), mientras que nueve cepas mostraron una disminución de 2 veces (AN5, AN10, AN11, AN20, AN33, AN44, AN63, AN64,

AN65), y en ocho cepas no se observó disminución de la CMI. Es importante resaltar que solo una cepa no porta el gen *aac(6')-I* (AN43).

Sólo una de las dos cepas resistentes a la ciprofloxacina (AN3) mostró una disminución de 2 veces la CMI en presencia de EPI (**Tabla 10**).

En el caso de las cinco cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en las que no se detectó el gen *aac(6')-I*, se observó que una cepa tuvo una disminución de 2 veces en la CMI para la amikacina (AN52), tres cepas disminuyeron 4 veces (AN53, AN55, AN56), y una cepa disminuyó 6 veces (AN66). Las CMI para ciprofloxacino en presencia de EPI mostraron que únicamente dos cepas disminuyeron 2 veces (AN55 y AN56). Para CTX, las cinco cepas resistentes mostraron una disminución de 2 veces la CMI y finalmente las cinco cepas no mostraron participación de la bomba de eflujo para MEM (**Tabla 11**).

7.7 Perfil plasmídico de las cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos

Conociendo que las cinco cepas *A. baumannii* resistentes portaban los mismos genes de resistencia, que provenían de la misma área hospitalaria, se realizó la extracción de plásmidos, y se evidenció que todas compartían el mismo perfil plasmídico (**Figura 12**).

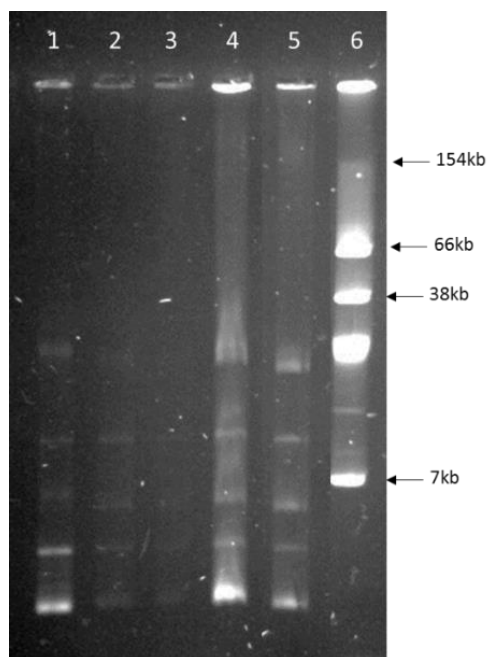


Figura 12. Extracción de plásmidos por QuickPrep de las cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. Línea 1: AN52, línea 2: AN53, línea 3: AN55, línea 4: AN56, línea 5: AN66, línea 6: *E. coli* NCTC 50192 con cuatro plásmidos: 154 kb, 66 kb, 38 kb y 7 kb.

En las **tablas 10 y 11** se concentran todos los resultados obtenidos de las cepas *A. haemolyticus* y *A. baumannii* que fueron analizadas.

Tabla 10. Características de los 24 aislados de *Acinetobacter haemolyticus*

Cepa	Servicio	Sitio de aislamiento	Fecha de aislamiento (d/m/a)	Pulsotipo	CMI (µg/ml)							Betalactamasas	EMA	
					CTX (CTX+EPI) [‡]	AN (AN+EPI) [‡]	CIP (CIP+EPI) [‡]	CRO	IPM	MEM	GN			
AN3	Urgencias	Líquido de diálisis peritoneal	05/04/2010	PT1	512 (256)	>512 (>512)	>64 (64)	>128	0.25	0.5	>512	OXA-575	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN4	Infectología	lcera	26/11/2010	PT4	8	64 (16)	8 (8)	2	1	1	4	OXA-214	TEM-229	AAC(6')-Iga [#]
AN5	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	02/09/2011	PT6	8	64 (32)	<0.5	4	1	2	4	OXA-265	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN7	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	02/11/2011	PT3	8	32 (32)	<0.5	2	0.25	0.5	4	OXA-575	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN10	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	16/03/2012	PT11	8	64 (32)	<0.5	2	0.5	0.5	4	OXA-264	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN11	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	29/03/2012	PT5	16 (8)	64 (32)	<0.5	8	1	2	6	OXA-265	TEM-229	AAC(6')-Igb ^l
AN13	Cirugía	Líquido de diálisis peritoneal	17/10/2012	PT7	8	32 (32)	<0.5	4	0.5	1	8	OXA-265	TEM-229	AAC(6')-Igb ^l
AN17	Urgencias	Líquido de diálisis peritoneal	10/03/2013	PT2	4	16	<0.5	2	0.25	0.25	4	OXA-265 truncada por IS <i>Aba</i> 125	TEM-229	AAC(6')-Ig
AN20	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	13/06/2013	PT9	8	64 (32)	<0.5	2	0.25	0.25	4	OXA-265 truncada por IS <i>Aba</i> 125	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN27	Urgencias	Herida	24/02/2014	PT12	32 (4)	64 (16)	<0.5	8	0.25	2	6	OXA-265	NP	AAC(6')-Igb ^l
AN33	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	12/08/2014	NT	8	128 (64)	0.5	6	0.5	1	8	OXA-214	TEM-229	AAC(6')-Ig
AN34	Urgencias	Líquido de diálisis peritoneal	22/08/2014	NT	4	128 (32)	<0.5	2	0.5	0.5	6	OXA-214	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN43	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	24/04/2015	PT17	8	64 (16)	<0.5	2	0.5	0.5	6	Codón de paro 253 a.a.	TEM-229	NC
AN44	Urgencias	Líquido de diálisis peritoneal	11/08/2015	PT13	16 (4)	128 (64)	<0.5	4	0.5	2	6	OXA-265	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN57	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	28/03/2016	PT8	>512 (>512)	16	<0.5	>128	128	>128(>128)	4	OXA-265 y NDM-1	TEM-229	AAC(6')-Ig
AN58	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	02/04/2016	NT	8	64 (64)	<0.5	4	1	0.5	8	OXA-214	TEM-229	AAC(6')-Ig
AN60	Urgencias	Líquido de diálisis peritoneal	10/04/2016	PT14	8	32 (32)	<0.5	2	1	0.25	4	OXA-215	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN61	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	26/01/2016	PT20	4	32 (32)	<0.5	2	0.5	0.25	4	OXA-264	TEM-229	AAC(6')-Igc*
AN62	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	02/05/2016	PT15	8	64 (16)	<0.5	2	0.5	0.5	4	OXA-214	TEM-229	AAC(6')-Ig
AN63	Urgencias	Líquido de diálisis peritoneal	03/05/2016	PT16	8	32 (16)	<0.5	4	1	0.5	4	OXA-575	209 Δ 78aa	AAC(6')-Igc*
AN64	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	23/05/2016	PT18	8	64 (32)	<0.5	2	0.5	0.25	4	OXA-265 truncada por IS <i>Aba</i> 125	NP	AAC(6')-Ig
AN65	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	29/05/2016	PT10	8	128 (64)	<0.5	2	1	1	8	OXA-214	NP	AAC(6')-Ig
AN67	M.I.	Líquido de diálisis peritoneal	03/09/2016	PT19	8	64 (64)	<0.5	4	1	2	8	OXA-214	NP	AAC(6')-Ig
AN69	Urgencias	Líquido de diálisis peritoneal	18/11/2016	NT	16 (8)	32 (32)	<0.5	8	1	4	4	OXA-265	NP	AAC(6')-Ig

M.I. Medicina Interna. PT. PFGE-Pulso tipo. NT. No tipificable. ND. No determinada. NP. No porta. EMA. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos, AAC(6')-I variantes, número de acceso: *MK468738, *MK468739, †MK468740. Δ. Deleción, a.a. aminoácidos. CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona, IPM: imipenem, MEM: meropenem, GN: gentamicina, AN: amikacina, CIP: ciprofloxacino. CLSI, 2018. ‡EPI: Inhibidor de bombas de expulsión por sus siglas en inglés, (Phenylalanine-Arginine-Beta-Naphthylamide a 25mg/L), en negrita se resaltan las CMI que disminuyeron en presencia de EPI únicamente se realizó el ensayo en las cepas resistentes.

Tabla 11. Características de las cepas *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos

Cepa	Servicio	Sitio de aislamiento	Fecha de aislamiento (d/m/a)	Pulsotipo	CMI (µg/ml)								Genotipo
					CTX (CTX+EPI [‡])	MEM (MEM+EPI [‡])	AN (AN+EPI [‡])	CIP (CIP+EPI [‡])	CAZ	CRO	IPM	GN	
AN52	U.P.Q.	Biopsia	02/01/2016	PT1a	1024 (512)	32 (32)	128 (64)	256 (256)	>128	>512	64	32	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23}
AN53	U.P.Q.	Biopsia	03/02/2016	PT1b	1024 (512)	32 (32)	64 (16)	256 (256)	>128	>512	64	32	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23}
AN55	U.P.Q.	Biopsia	02/03/2016	PT1c	1024 (512)	32 (32)	64 (16)	256 (128)	>128	>512	64	32	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23}
AN56	U.P.Q.	Biopsia	29/03/2016	PT1d	1024 (512)	32 (32)	64 (16)	256 (128)	>128	128	64	32	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23}
AN66	U.P.Q.	Biopsia	01/06/2016	PT2	1024 (512)	32 (32)	>128 (16)	256 (256)	>128	>512	64	>128	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23}

U.P.Q.: Unidad Pediátrica de Quemados. CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, IPM: imipenem, MEM: meropenem, GN: gentamicina, AN: amikacina, CIP: ciprofloxacino. CLSI, 2018.
[‡]EPI: Inhibidor de bombas de expulsión por sus siglas en inglés, (Phenylalanine-Arginine-Beta-Naphthylamide a 25mg/L), en negrita se resaltan las CMI que disminuyeron en presencia de EPI.

7.8 Secuenciación masiva del genoma de la cepa *A. haemolyticus* AN54 portadora de *bla*_{NDM-1}

Se identificaron dos cepas de *A. haemolyticus* resistentes a carbapenémicos, portadoras de *bla*_{NDM-1}, que se aislaron de muestras de líquido de diálisis peritoneal de un paciente masculino de 12 años, que fue ingresado al HNP en el servicio de Medicina Interna por enfermedad renal en etapa terminal; la primera (AN54) se recibió en febrero de 2016, posteriormente la otra (AN57) el mes de marzo del mismo año; estas cepas se identificaron inicialmente como *Acinetobacter* spp. por el sistema Vitek 2 y posteriormente fueron reclasificadas como *A. haemolyticus* por análisis parcial del gen *rpoB*.

El fenotipo de las cepas fue muy similar, ambas mostraron CMI's altas de los antibióticos probados, especialmente para betalactámicos de amplio espectro, a excepción ticarcilina-ácido clavulánico (TIM), y sólo la cepa AN54 fue resistente a amikacina. En cuanto a genes buscados por PCR, únicamente se detectaron *bla*_{NDM-1} y *bla*_{OXA-265} (Tabla 12).

Tabla 12. Datos de las cepas *A. haemolyticus* resistentes a carbapenémicos

Cepa	Fecha de aislamiento	Sitio Anatómico	Fenotipo de resistencia	CMI (µg/mL)							Genotipo	
				CAZ	FEP	IPM	CTX (CTX+EPI [‡])	MEM (MEM+EPI [‡])	AN (AN+EPI [‡])	GN	CIP	
AN54	29/02/2016	LDP	PIP, TIC, SAM, TZP, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM, AN	>128	>128	>128	>128(>128)	>128 (>128)	64 (32)	4	<0.5	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-265} , <i>aphA6</i> [*] , <i>aac</i> (6)-Ib [*]
AN57	28/03/2016	LDP	PIP, TIC, TZP, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM	>128	>128	>128	>128(>128)	>128 (>128)	16 (16)	4	<0.5	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-265}

*Obtenidos por secuenciación masiva. LDP. Líquido de diálisis peritoneal. PIP: Piperacilina, TIC: Ticarcilina, SAM: Ampicilina/Sulbactam, TZP: Piperacilina/Tazobactam, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, GN: Gentamicina, AN: Amikacina, CIP: Ciprofloxacino, FEP: cefepime, CLSI, 2018. [‡]EPI: Inhibidor de bombas de expulsión por sus siglas en inglés, (Phenylalanine-Arginine-Beta-Naphthylamide a 25mg/L), en negrita se resaltan las CMI que disminuyeron en presencia de EPI.

Debido al fenotipo de resistencia de las cepas, se decidió hacer la prueba fenotípica para carbapenemasas clase B. Es sabido que este tipo de pruebas a veces son poco específicas, pero pueden ser una herramienta útil para la detección rápida de estas enzimas en el laboratorio. En el experimento se obtuvo un resultado positivo, en el cual el EDTA inhibió claramente el efecto de la enzima sobre IPM y MEM, corroborando que las cepas portaban una carbapenemasa clase B (**Figura 13**).

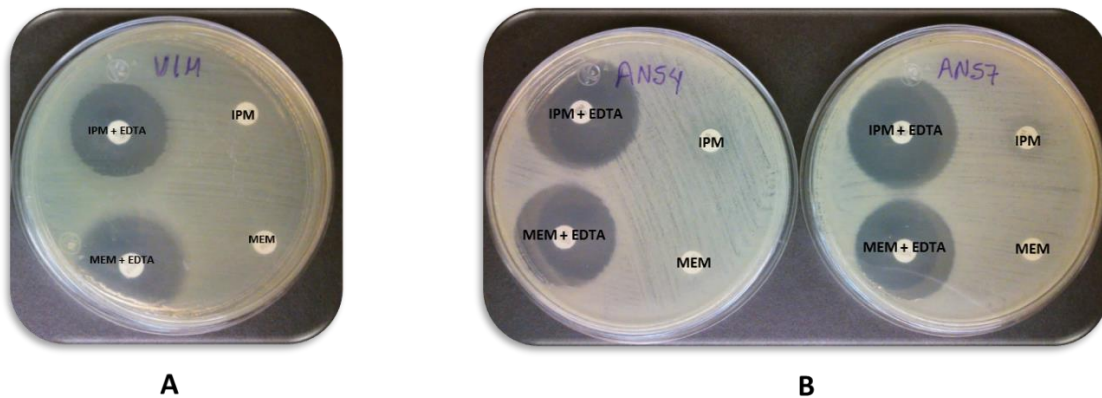


Figura 13. Prueba fenotípica para detección de metalo-beta-lactamasas. A) Resultados positivo de la cepa control *P. aeruginosa* con VIM. **B)** Resultado positivo de la prueba en las cepas *A. haemolyticus* AN54 y AN57.

En cuanto a la participación de las bombas de expulsión, la presencia de EPI (PA β N) no afectó la CMI de cefotaxima (CTX) y meropenem (MEM) en la cepa AN54, mientras que se observó una disminución de 2 veces en la CMI de amikacina (AN). El resultado fue idéntico para CTX y MEM en la cepa AN57; sin embargo, no hubo cambios de CMI de amikacina (**Tabla 12**).

Por otro lado, como ha sido reportado que *bla*_{NDM-1} es movilizada por plásmidos, se hizo la extracción de estos elementos encontrando que las cepas presentaron el mismo perfil plasmídico, donde presuntivamente se tienen seis bandas plasmídicas (**Figura 14**).

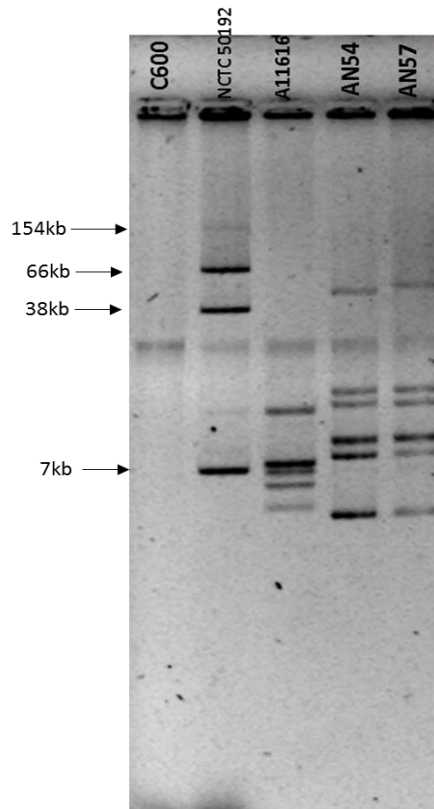


Figura 14. Perfil plasmídico de las cepas AN54 y AN57 obtenido por el método QuickPrep. Línea 1: *E. coli* C600, línea 2: *E. coli* NCTC50192 (el tamaño de sus plásmidos se señala con flechas), línea 3: *A. haemolyticus* A11616, línea 4: cepa AN54, línea 5: cepa AN57.

Debido a que las dos cepas comparten características fenotípicas y genotípicas, además de que por campos pulsados resultaron ser estrechamente relacionadas, se decidió estudiar detalladamente a la cepa AN54. De manera que primero se determinó si el gen *bla*_{NDM-1} se encontraba presente en plásmido o cromosoma. Los resultados obtenidos por *Southern blot* mostraron que el gen *bla*_{NDM-1} fue detectado en uno de los seis plásmidos que porta la cepa (**Figura 15**).

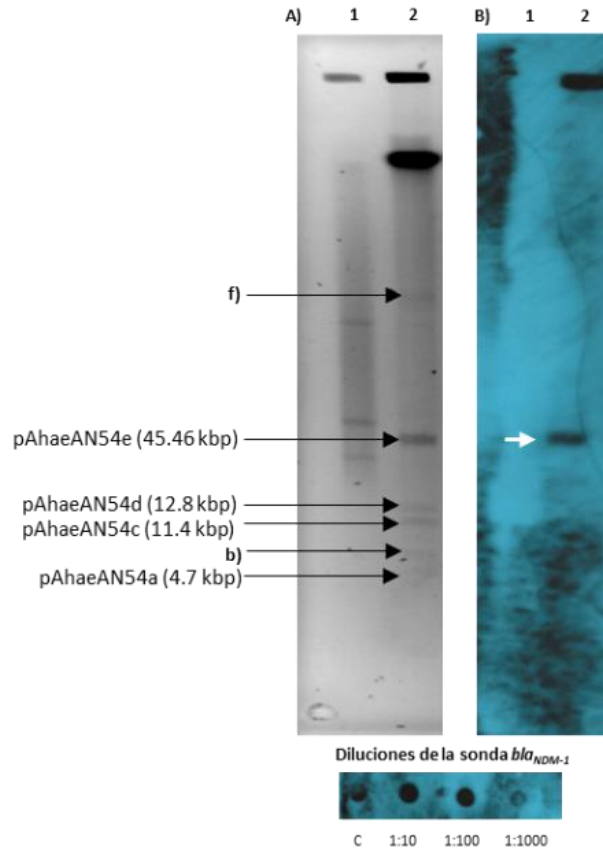


Figura 15. A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas: línea 1: *E. coli* NCTC90152, línea 2. Ceba AN54. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda *bla*_{NDM-1}. La flecha blanca indica que el gen *bla*_{NDM-1} fue localizado en el plásmido pAhaeAN54e. Los tamaños de plásmido se comprobaron por secuenciación masiva.

Al determinar que el gen *bla*_{NDM-1} se encontraba en un plásmido, se realizaron ensayos de transferencia de material genético por transformación para investigar si el plásmido podría ser captado por cepas de *E. coli* competentes. Sin embargo, no se lograron recuperar células electroporadas en las placas de selección.

También se hicieron experimentos de conjugación usando como antibióticos de selección Rif+MEM (150µg/mL+ 32µg/mL), en el que se obtuvieron 17 colonias como probables transconjugantes. Para verificar que realmente eran células transconjugantes, se realizó una PCR de colonia buscando los genes *uidA* (marcador de *E. coli*) que fue negativo, y *bla*_{NDM-1} (gen de interés) que fue positivo

en todas las cepas seleccionadas, demostrando que no se trataban de transconjugantes, sino que la cepa donadora (AN54) logró adaptarse y crecer en alta concentración de rifampicina.

Debido a las características de la cepa AN54 descritas anteriormente, se secuenció completamente la cepa para conocer las características del plásmido portador de *bla*_{NDM-1} y algunos otros genes involucrados en la resistencia a los antimicrobianos que no se pudieron detectar mediante la amplificación de genes.

El genoma de la cepa se secuenció por dos tecnologías: Illumina MiSeq y PacBio RSII, y después de probar con varios ensambladores se determinó que el mejor ensamble fue el que se construyó por medio de Unicycler v. 0.4.1 y SPAdes v. 3.11.1 (**Anexo 8**), se usaron las lecturas de ambas tecnologías y se hizo un ensamble híbrido, lo que permitió cerrar el cromosoma y cuatro plásmidos, que fueron ingresados a la base de datos GenBank. Es importante señalar que sólo hay seis genomas completos de *A. haemolyticus* en la base de datos y este es el primero que se reporta de una cepa aislada en México (**Tabla 13**).

Tabla 13. Moléculas obtenidas por secuenciación masiva de la cepa AN54

Nombre de la molécula	Tamaño	Características	Núm. de acceso GenBank
Cromosoma	3.6 Mb	Circular	CP041224.1
pAhaeAN54a	4.7 Kb	Circular	CP041228.1
pAhaeAN54c	11.4Kb	Circular	CP041226.1
pAhaeAN54d	12.8Kb	Circular	CP041225.1
pAhaeAN54e	45.4Kb	Circular	CP041229.1
plUnnamed	6.4Kb	Lineal	CP041227.1

El análisis de secuenciación del genoma completo, reveló que AN54 posee un cromosoma con un tamaño aproximado de 3.6 Mb, en el que se localizaron los genes de resistencia a antibióticos: *bla*_{OXA-265} y *aac(6')*-I_g. Además, se encontraron genes para bombas de expulsión y sus reguladores: *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adel*, *adeK*, *adeR*, *adeS*, *macA* y *macB*, que se han reportado intervienen en la resistencia a múltiples fármacos, así como genes de resistencia a metales pesados *czcA* y *arsH*.

Los homólogos de las proteínas reguladoras AdeS y AdeR y los componentes de la bomba de eflujo AdeA, AdeB y AdeC comparten 72, 85, 86, 92 y 77% de identidad de aminoácidos, respectivamente, con las proteínas correspondientes de la cepa de referencia *A. baumannii* AYE (número de acceso: CU459141.1). Mientras que los homólogos de las proteínas Adel y AdeK tuvieron un 82 y 89% de identidad con la misma cepa de referencia. Sin embargo, la subunidad AdeJ no fue localizada en la cepa AN54.

Como se mencionó anteriormente, se obtuvo la secuencia completa de cuatro plásmidos que fueron nombrados por el orden de tamaño como: pAhaeAN54a (4.7 kbp), pAhaeAN54c (11.4 kbp) y pAhaeAN54d (12.8 kbp) que no acarrean genes de resistencia a los antimicrobianos (**Figura 16**) y el plásmido pAhaeAN54e (45.46 kbp) que porta *bla*_{NDM-1} y *aphA6*, del cual se ahondara más adelante.

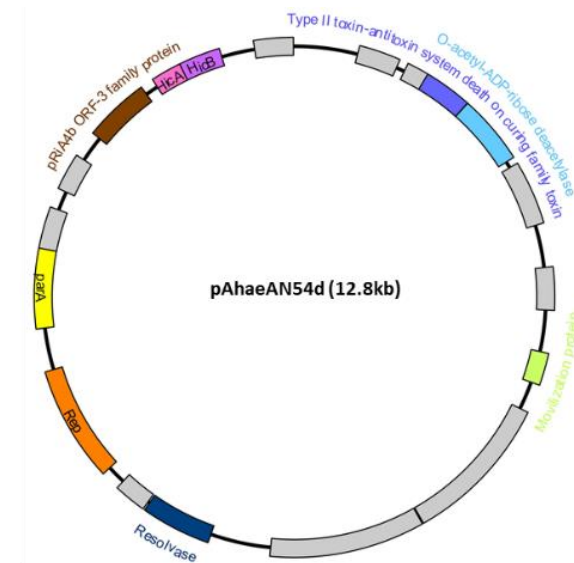
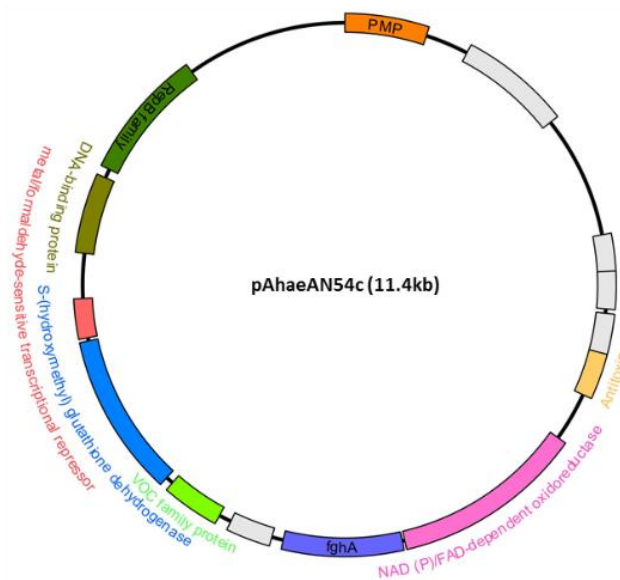


Figura 16: Representación de los plásmidos pAhaeAN54a, pAhaeAN54c y pAhaeAN54d de la cepa AN54 que no portan genes de resistencia a antibióticos. Con color gris se señalan los genes que codifican para proteínas hipotéticas. Imagen generada con XPlasMap.

El plásmido pAhaeAN54e también tuvo un transposón compuesto trunco, que es similar al transposón Tn125. Ambos transposones están conformados por la secuencia de inserción IS*Aba14* y los genes *aphA6*, *bla_{NDM-1}*, *ble* y *trpF*, pero a diferencia de Tn125, el transposón trunco de la cepa AN54 solo tiene una copia de la secuencia de inserción IS*Aba125*. También posee una transposasa de la familia IS91, que es 330 pb más grande que el gen de transposasa *insE* de los plásmidos pNDM-BJ02 y pNDM-BJ01 de *A. lwoffii*. Además, pAhaeAN54e tuvo la inserción de dos genes que codifican para proteínas hipotéticas río abajo de IS91 y uno más que está adyacente al gen de la recombinasa.

La estructura del transposón trunco es similar a la encontrada en el plásmido pNDM-BJ02 y a los plásmidos parcialmente secuenciados pABC7926 (Núm. de acceso: JQ080305.2) y pNDM-69122 (Núm. de acceso: LN611576.1) de *A. haemolyticus* **(Figura 19)**

Interesantemente, el plásmido pAhaeAN54e tuvo un 99% de identidad y 73% de cobertura con el plásmido p06-1619-NDM de *Providencia rettgeri* (núm. de acceso: KX832928.1) reportado en México. Estos plásmidos comparten 33 genes, incluidos *traA*, *traC*, *traD* y genes del sistema de secreción tipo IV. El plásmido p06-1619-NDM también contiene un elemento similar a Tn125 **(Figura 20)**.

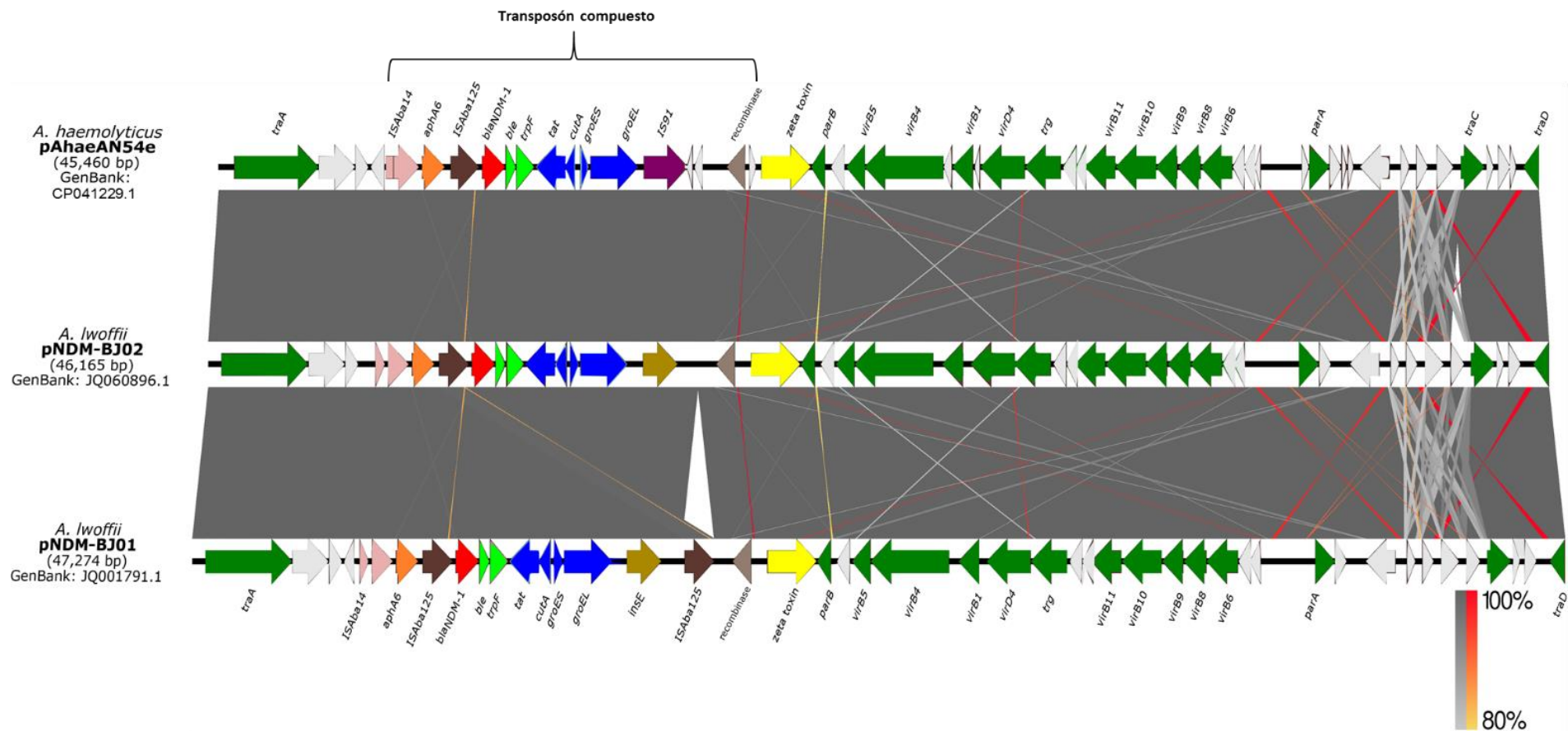


Figura 18. Representación esquemática y alineamiento del plásmido pAhaeAN54e de *A. haemolyticus* y los plásmidos pNDM-BJ02 y pNDM-BJ01 de *A. lwoffii*. Se dividieron en dos secciones: el transposón compuesto en el que se encuentran ISAbal125, blaNDM-1 e IS91. Los genes conocidos (*backbone*) están marcados en verde y las proteínas hipotéticas están marcadas en blanco. Las barras grises indican 99% de identidad, y las regiones invertidas se indican en rojo. Imagen construida con Easyfig.

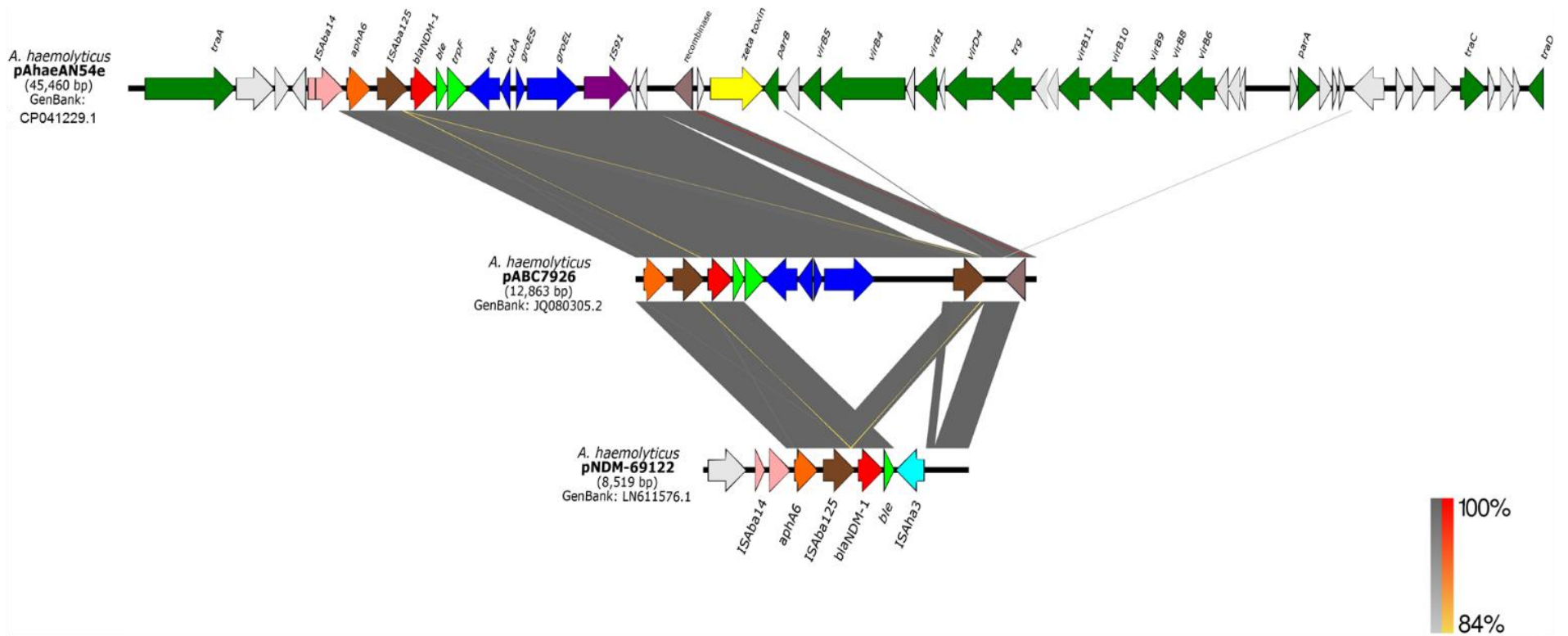


Figura 19. Comparación entre el plásmido pAhaeAN54e y los plásmidos parcialmente secuenciados pABC7926 y pNDM69122 de *A. haemolyticus*. Imagen construida con Easyfig.

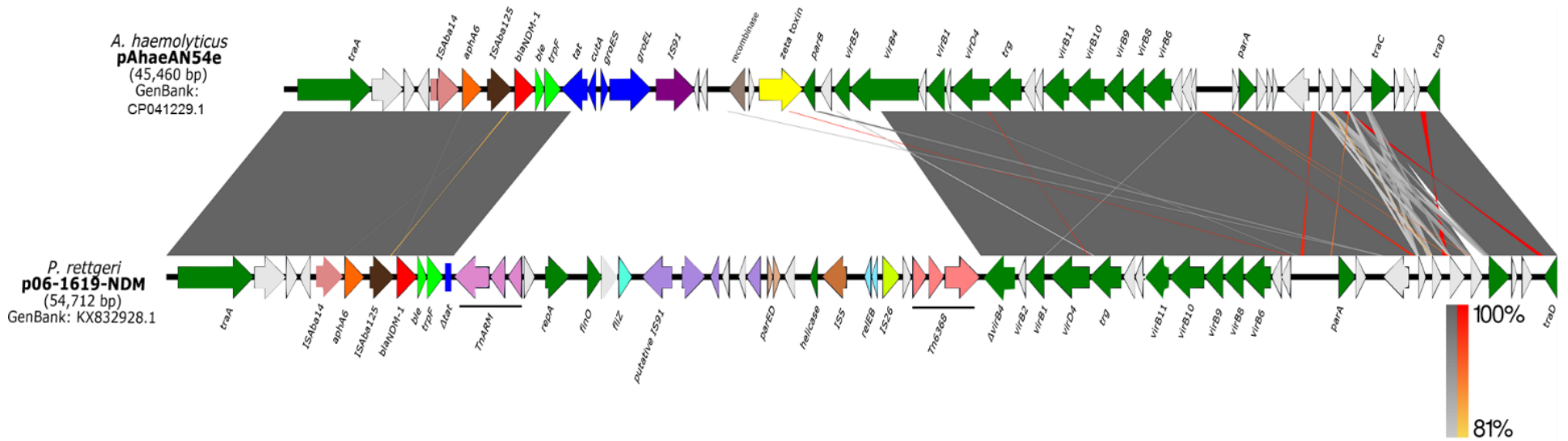


Figura 20. Comparación entre los plásmidos pAhaeAN54e de *A. haemolyticus* y p06-1619-NDM de *P. rettgeri*, ambos aislados en México. Imagen construida con Easyfig.

7.8.2 Análisis de la porina CarO de la cepa AN54

La porina CarO se ha relacionado con la resistencia a antibióticos carbapenémicos en cepas de *A. baumannii*, pero en especies no-*baumannii* no ha sido estudiada, por ello se quiso analizar en la cepa *A. haemolyticus* AN54 resistente a carbapenémicos y a cefalosporinas. Al hacer el alineamiento de las porinas de cepas de referencia *A. baumannii* y la cepa de interés, el resultado fue que la porina CarO de la cepa AN54 tiene entre un 22-26% de identidad y del 13-46% de cobertura con los alelos identificados en *A. baumannii* (CarO1, CarO2, CarO3, ATCC17978), lo que significa que tienen poca similitud debido a diversos cambios aminoacídicos en la estructura, así como en la longitud de la proteína.

También se comparó con la porina de las cepas *A. haemolyticus* AN3 y AN4 sensibles a carbapenémicos, encontrando que *A. haemolyticus* AN54 tuvo un 99.65% de identidad con la homóloga de la cepa AN3 (sensible a carbapenémicos pero resistente a cefalosporinas) y 77.12% de identidad con la de la cepa AN4 (sensible a carbapenémicos y cefalosporinas) (**Anexo 9**).

En la **figura 21** se ilustra el modelo *in silico* de la porina CarO de la cepa AN54.

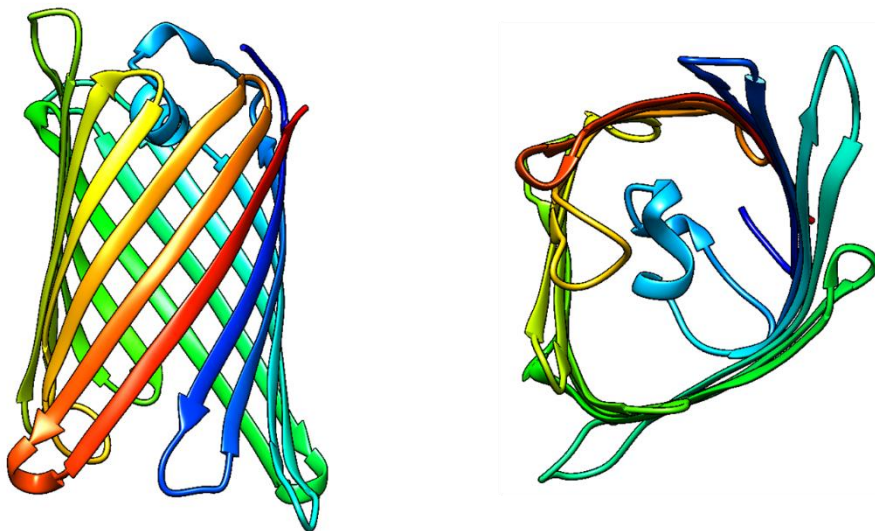


Figura 21. Modelo *in silico* de la proteína CarO de la cepa AN54 portadora de *bla*_{NDM-1}.
Modelo realizado con Phyre2 v2.0 y Chimera v1.12.

7.9 Secuenciación masiva del genoma de la cepa *A. baumannii* AN71

La bacteria proviene de una muestra de líquido sinovial de un paciente masculino de 14 años que fue recolectada en diciembre de 2016 en el servicio de cirugía del Hospital para el niño Poblano. Esta cepa se seleccionó porque presentó un fenotipo de resistencia por Kirby-Baüer a todos los antibióticos probados, así como elevada CMI en el experimento de participación de bombas de expulsión en el cual se obtuvo que la CMI en presencia de EPI disminuyó 2 veces para CTX y MEM y no hubo cambio en CMI para AN y CIP (**Tabla 14**).

Por *PCR* se detectaron los genes *bla*_{OXA-51-like} (marcador para *A. baumannii*) y *bla*_{OXA-214-like} (marcador de *A. haemolyticus*). Por secuenciación parcial del gen *rpoB* se clasificó como *A. haemolyticus*; lo interesante fue que una vez que se obtuvo el ensamble del genoma (**Anexo 10**) se sometió a un análisis de identidad promedio de nucleótidos (*ANI: Average Nucleotide Identity*), obteniendo el 99.55% de identidad con el genoma de la cepa de referencia *A. baumannii* ACICU (Núm. de acceso: NZ_CP031380.1), por lo que se reclasificó como *A. baumannii*.

7.9.1 Tipificación multilocus y relación clonal

La tipificación multilocus de secuencias (*MLST* por sus siglas en inglés) arrojó que AN71 pertenece a la secuencia tipo (ST) 2 del esquema Pasteur y a la secuencia tipo 369 del esquema Oxford (Bartual).

Considerando que la cepa AN71 es *A. baumannii*, se analizó por *PFGE* para ver si tenía alguna relación clonal con las cepas resistentes de *A. baumannii* aisladas de la Unidad Pediátrica de Quemados (UPQ), obteniendo que AN71 perteneció a un pulsotipo distinto con un coeficiente de Dice de ≈ 52 , por lo que no está genéticamente relacionada con las cepas de esa área hospitalaria (**Figura 22**).

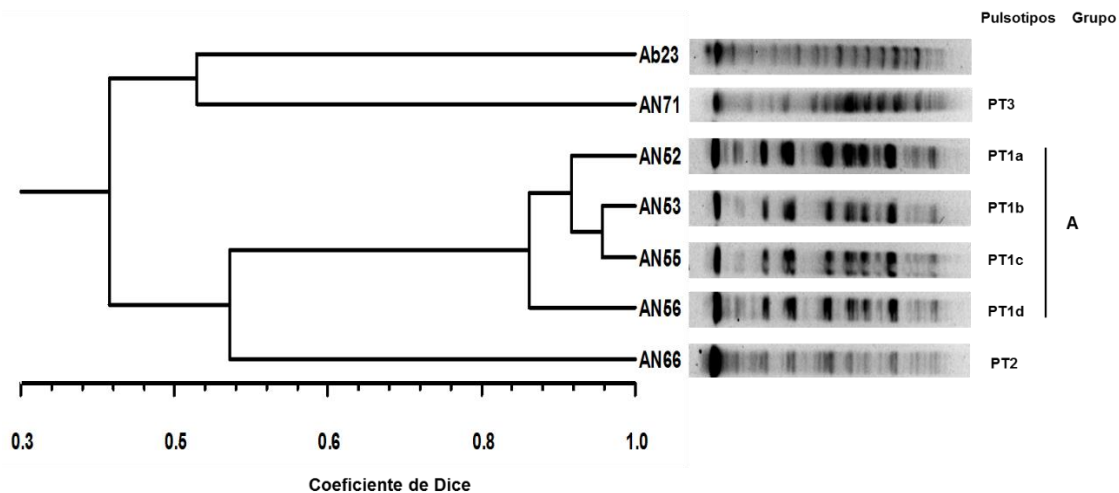


Figura 22. Dendrograma obtenido de las cepas *A. baumannii* resistentes de la Unidad Pediátrica de Quemados y la obtenida del servicio de Cirugía. Los aislados muestran un coeficiente de Dice ≤ 80 (≈ 52) lo que indica que no están genéticamente relacionadas. **Ab23:** Cepa control *A. baumannii*. **PT:** Pulsotipos.

7.9.2 Análisis del resistoma y elementos genéticos movilizables asociados con la resistencia a antibióticos en la cepa *A. baumannii* AN71

La cepa fue portadora de diversos genes de resistencia a varias familias de antibióticos como betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, así como componentes de bombas de expulsión (**Tabla 14 y Anexo 11**).

Los genes que codifican para las betalactamasas OXA-66 (familia OXA-51), ADC-56, TEM-1D, se localizaron por la anotación en el cromosoma de la cepa y no se encontraron secuencias de inserción río arriba que pudieran provocar su sobre expresión.

Tabla 14. Datos generales y genotipo de resistencia obtenidos por secuenciación masiva de la cepa AN71

Cepa	Área hospitalaria	Sitio de aislamiento	ST	CMI (µg/mL)						Genotipo de resistencia	Bombas de expulsión	Genes de virulencia	
				CTX (CTX+EPI [†])	MEM (MEM+EPI [†])	AN (AN+EPI [†])	CRO	IPM	GN				CIP
AN71	Cirugía	Líquido sinovial	2 (Pasteur) 369 (Oxford)	1024(512)	512(128)	1024(1024)	>128	>128	>128	64(64)	<i>bla</i> _{ADC-56} <i>bla</i> _{OXA-66} <i>bla</i> _{OXA-72} <i>bla</i> _{TEM-3D} <i>aadA1a</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>aph(6)-Id</i> <i>aac(6)-Ib7*</i> <i>sul1</i> <i>sul2</i> <i>armA</i> <i>catB8</i>	<i>adeA</i> <i>adeB</i> <i>adeC</i> <i>adeF</i> <i>adeG</i> <i>adeH</i> <i>adel</i> <i>adeJ</i> <i>adeK</i> <i>adeL</i> <i>adeN</i> <i>abeS</i> <i>abeM</i> <i>tetB</i> <i>tetR</i>	lpxB

aac(6)-Ib7* también es nombrada como *aacA4-8* en la base de datos proporcionada por Thomas Jové. **CTX: cefotaxima, **CRO:** ceftriaxona, **IPM:** imipenem, **MEM:** meropenem, **GN:** gentamicina, **AN:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacino. **CLSI, 2018.** **†EPI:** Inhibidor de bombas de expulsión por sus siglas en inglés, (Phenylalanine-Arginine-Beta-Naphthylamide a 25mg/L), en negrita se resaltan las CMI que disminuyeron en presencia de EPI. **lpxB:** gen que codifica para la enzima Lípido-A-disacárido sintasa.

En parte de la secuencia del contig_21 se encontró un arreglo de dos enzimas modificadoras de aminoglucósidos, la secuencia de inserción IS91-like, *arsR*, *tetR* y *tetB*, pero con los datos que se tienen no hay evidencia suficiente de que pudieran estar constituyendo alguna isla genómica de resistencia (**Figura 23**).

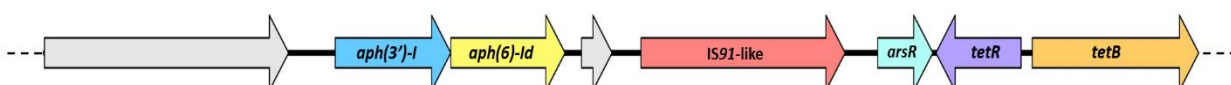


Figura 23. Representación parcial del contig_21. Las flechas en color gris representan a las proteínas hipotéticas. Imagen construida con XPlasMap.

La cepa posee un integron clase 1 ya reportado en la base de datos Integrall, llamado In439, con extremos 5' y 3' conservados y que en la región variable incluye genes que codifican para dos enzimas modificadoras de aminoglucósidos y uno para una enzima cloranfenicol acetiltransferasa (**Figura 24**).

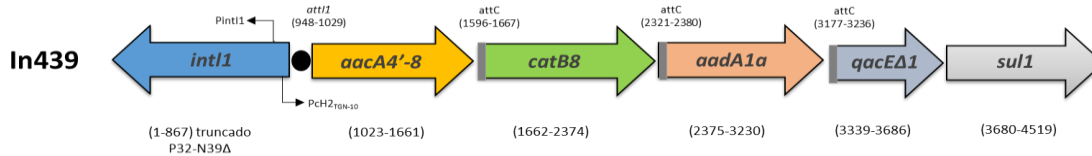


Figura 24. Representación del integron In439 que porta la cepa AN71.

Nota: Río abajo del gen *sul1* se encontró IS91, IS5, un gen que codifica para una proteína hipotética y *armA*.

7.9.3 Porina CarO de la cepa AN71

La porina CarO de la cepa AN71 tuvo un 100% de identidad y 100% de cobertura con el alelo CarO3 de *A. baumannii* (**Anexo 12**).

En la **figura 25** se aprecia el modelo *in silico* de la porina CarO de la cepa AN71.

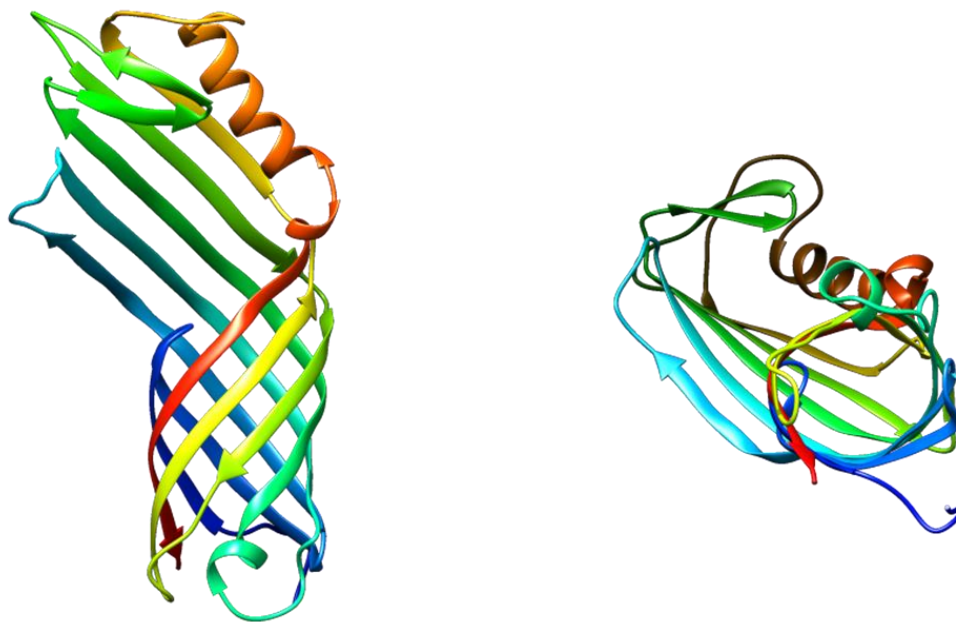


Figura 25. Modelaje *in silico* de la porina CarO de la cepa AN71.

Modelos realizados con Phyre2 v2.0 y Chimera v1.12.

Se quiso comparar con la porina CarO de la cepa *A. haemolyticus* AN54 encontrando que tuvo 22.03% de identidad y 47% de cobertura por lo que las porinas son diferentes de acuerdo con la especie (**Figura 26**).

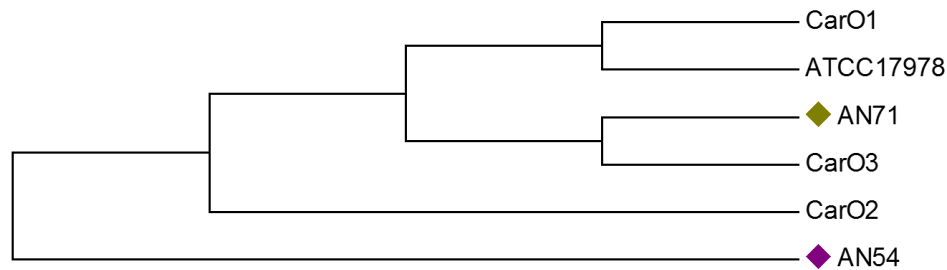


Figura 26. Dendrograma que representa las diferencias entre los alelos de las porinas CarO1, CarO2, CarO3 y ATCC17978 de *A. baumannii* con las cepas AN71 (*A. baumannii*) y AN54 (*A. haemolyticus*). Construido con MEGA7 software, UPGMA, Método de número de diferencias, 100 repeticiones.

7.9.4 Estudio del plásmido portador de *bla*_{OXA-72}

Se logró completar la secuencia de un plásmido obtenido de un *contig* consenso de los ensamblados con SPAdes. Este plásmido fue nombrado pAbaAN71, tiene una longitud de 9990 pb, un contenido de G+C del 35% y 13 marcos de lectura abiertos. En su estructura se identificaron genes de movilización y replicación (*mobA/mobL* y *repA*), así como genes accesorios que codifican para dos proteínas unidoras de ADN (*DNA-binding protein* y *Arc*) y una proteína con dominio hélice-vuelta-hélice, además de seis genes que codifican para proteínas hipotéticas de función desconocida. El gen de resistencia *bla*_{OXA-72} se localizó flanqueado río arriba por la secuencia de inserción *ISAba48* y río abajo por una proteína hipotética; es importante mencionar que se encontraron sitios de recombinación XerC/XerD sitiendo la región comprendida río abajo de *Arc* y *bla*_{OXA-72}.

El plásmido pAbaAN71 tuvo un 100% de identidad y 100% de cobertura con el plásmido pAba10042a (10062pb), 99.99% de identidad de nucleótidos y 90% de

cobertura con el plásmido pAba9201a (9024pb); 99.93% de identidad y 100% de cobertura con el plásmido pAba5845a (9935pb), de cepas clínicas de *A. baumannii* aisladas en otros estados de la república mexicana. En la **figura 27** se ilustra la comparación de estos plásmidos en donde se aprecia que la región sombreada en color naranja, comprendida desde el gen *bla*_{OXA-72} hasta *Arc* se encuentra insertada en sentido inverso en los plásmidos pAba10042a y pAba5845a.

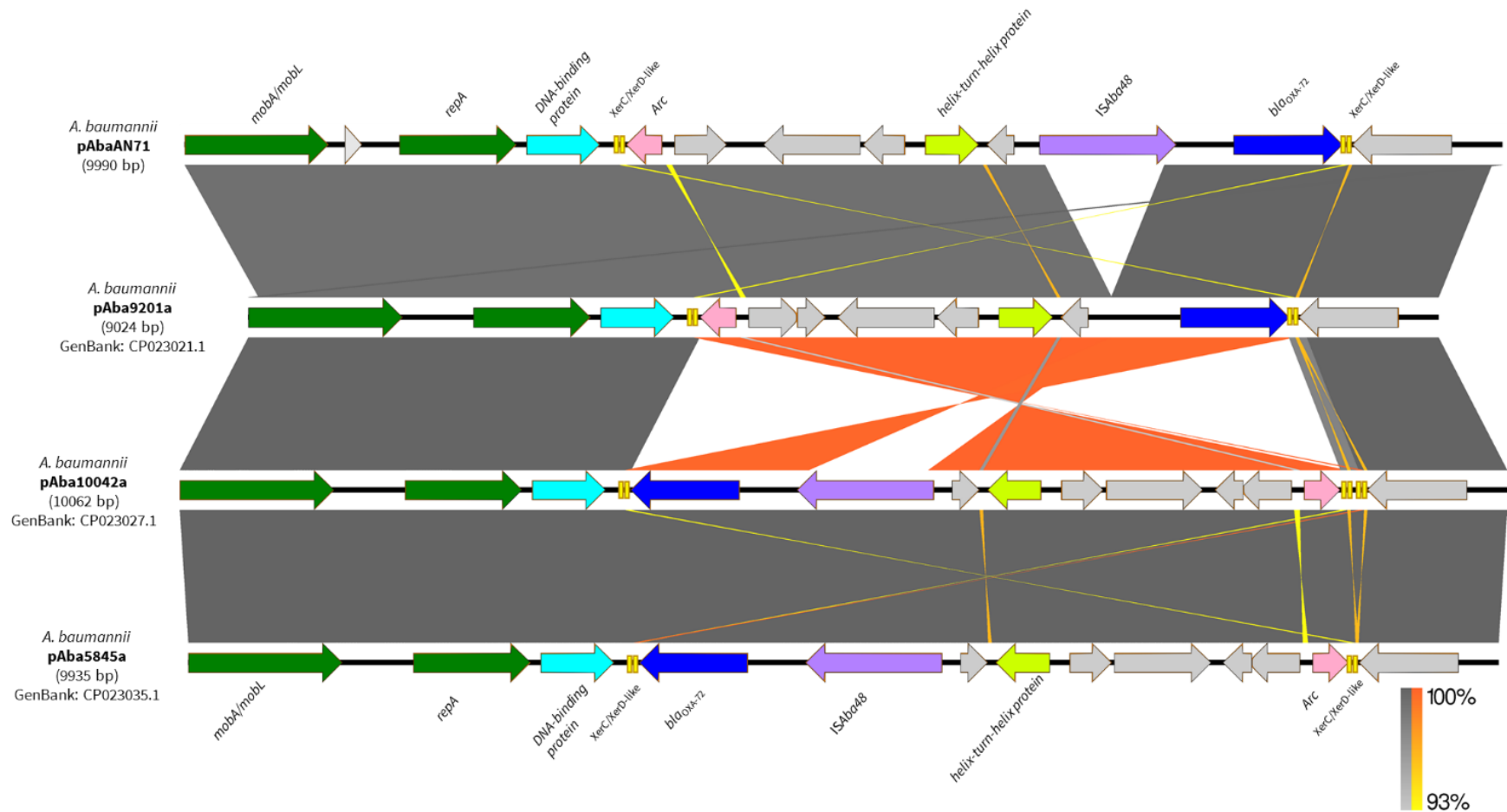


Figura 27. Comparación de la secuencia del plásmido pAbaAN71 y los plásmidos pAba9201a, pAba10042a y pAba5845a que portan *bla_{OXA-72}*. En verde oscuro se marcan los genes implicados en la movilización y replicación, en distintos colores genes accesorios y las proteínas putativas están marcadas en blanco. Las barras grises indican el porcentaje de identidad entre los plásmidos y en naranja las regiones invertidas. Imagen construida con Easyfig.

7.10 Cepas de *Acinetobacter* spp. del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla

El hospital regional es catalogado como de tercer nivel y atiende desde pacientes neonatos hasta adultos mayores, del estado de Puebla y la región. Se recibieron 20 aislados del periodo 2015-2018 a los cuales se les confirmó pureza y se descartaron 5 cepas que no pertenecían al género *Acinetobacter* por lo que 15 cepas fueron parcialmente estudiadas. En los **gráficos 9 y 10** se muestran los porcentajes de cepas por sitio de aislamiento y por área hospitalaria.

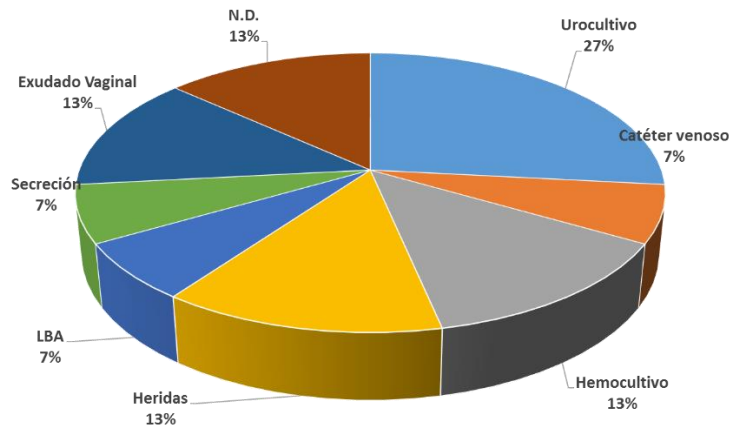


Gráfico 9. Porcentaje de cepas por origen de aislamiento del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, n=15. N.D. No determinado, **LBA:** Lavado bronquio alveolar.

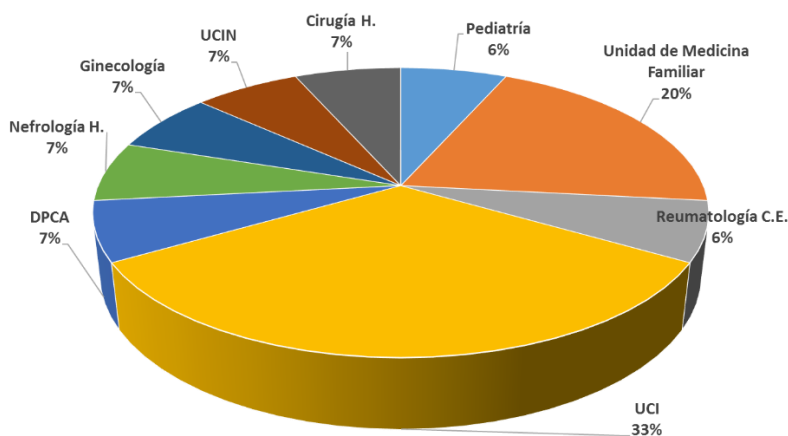


Gráfico 10. Porcentaje de cepas por servicio de aislamiento del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, n=15. DPCA: Diálisis peritoneal continua ambulatoria, **UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos, **UCIN:** Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal, **C.E.:** Consulta externa.

7.10.2 Fenotipo y genotipo de resistencia de las cepas aisladas del H.R. I.S.S.T.E. Puebla

Se realizó el perfil de resistencia por difusión en disco en el cual se aprecia que por encima del 40% de las cepas presentó sensibilidad a los antibióticos probados, no obstante, más del 30% mostró resistencia a betalactámicos como piperacilina y ticarcilina, incluyendo los combinados con inhibidor piperacilina/tazobactam y ticarcilina/ác. clavulánico, además de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenémicos y quinolonas y en menor porcentaje a aminoglucósidos y tetraciclina (**Gráfico 11**).

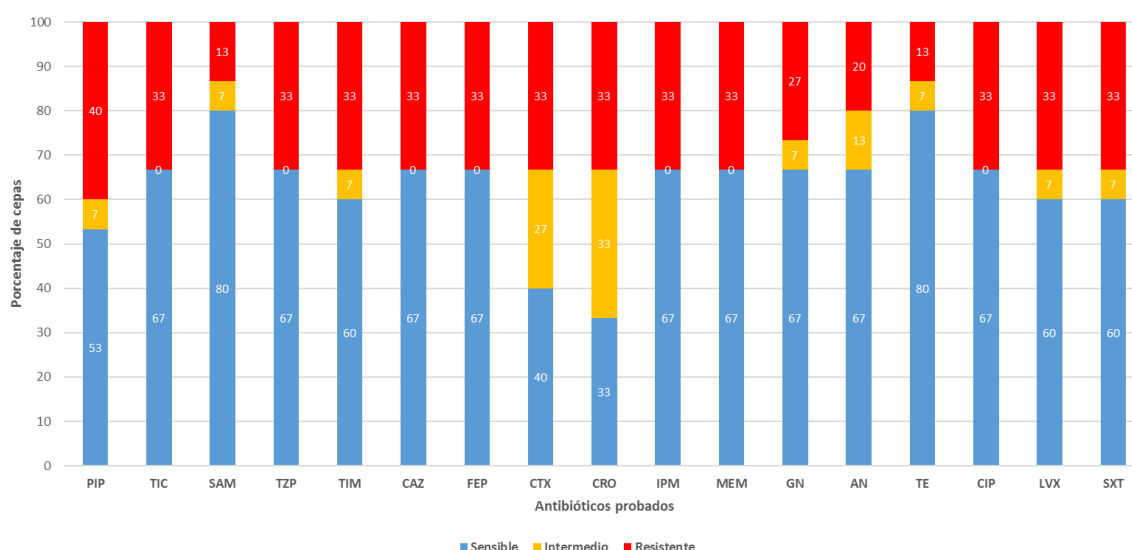


Gráfico 11. Perfil de sensibilidad por Kirby-Bauer de las cepas de *Acinetobacter spp* aisladas del Hospital Regional I.S.S.T.E. Puebla, n=15. PIP: Piperacilina, TIC: Ticarcilina, SAM: Ampicilina/Sulbactam, TZP: Piperacilina/Tazobactam, TIM: Ticarcilina/Ác. Clavulánico, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriaxona, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, GN: Gentamicina, AN: Amikacina, TE: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol. CLSI, 2018

A las 15 cepas se les buscaron por PCR genes que codifican para las betalactamasas OXA-51, OXA-23, OXA-24, OXA-58 y OXA-214. En el **gráfico 12** se muestra el número de cepas que los portan.

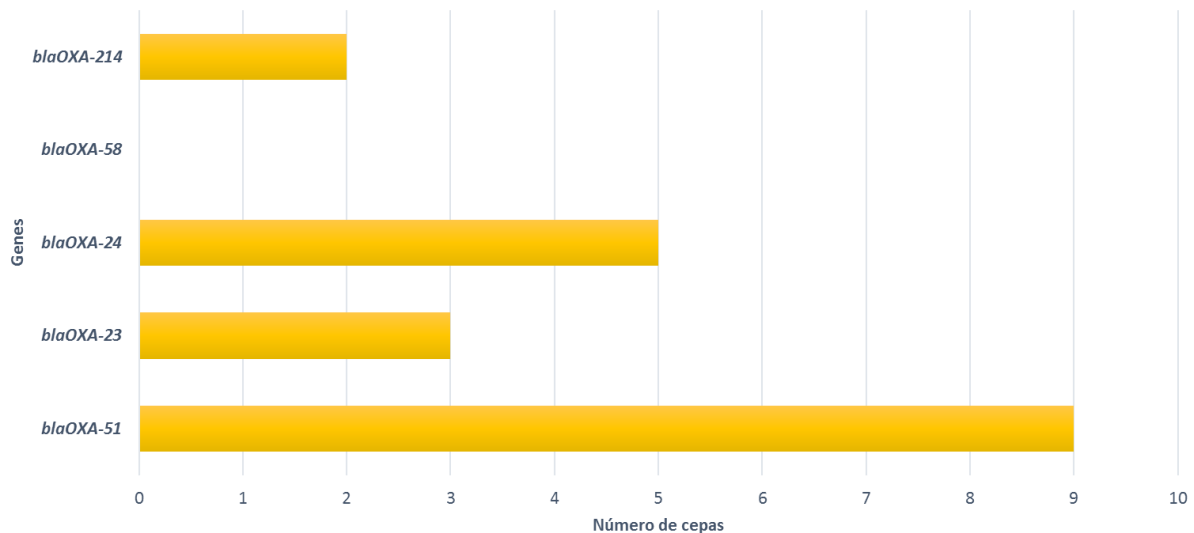


Gráfico 12. Número de cepas portadoras de genes que codifican para betalactamasas clase D, n=15.

Se detectaron 5 cepas *A. baumannii* multidrogosresistentes y resistentes a carbapenémicos. Las cepas AE14, AE16 y AE19 cuyo perfil de resistencia es muy similar, portaron *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-24}, pero provenían de distintas áreas hospitalarias. Cabe resaltar que la cepa AE19 fue aislada de un paciente ambulatorio del servicio de ortopedia de la unidad de medicina familiar, que es una clínica separada del hospital de especialidades.

Las otras dos cepas AE22 y AE23 que tuvieron el mismo fenotipo y genotipo de resistencia se aislaron de pacientes internados en la Unidad de Cuidados Intensivos y fueron recuperadas en un lapso no mayor a tres meses. En la **tabla 15** se concentran los datos de las cepas de este hospital.

Tabla 15. Datos de las cepas de *Acinetobacter* spp aisladas del Hospital Regional I.S.S.T.E. Puebla, n=15.

Cepa	Servicio hospitalario	Sitio de aislamiento	<i>rpoB</i>	Fecha de aislamiento (d/m/a)	CMI µg/mL		Fenotipo de resistencia	Genotipo de resistencia
					IPM	MEM		
AE04	Pediatría	Catéter venoso central	<i>A. ursingii</i>	26/06/2015	2	1	PIP, TIM, CTX, CRO,	NC
AE07	Reumatología C.E.	Urocultivo	<i>A.schindleri</i>	11/11/2015	6	0.5	Sensible a todos los antibióticos probados	<i>bla</i> _{OXA-51}
AE11	UMF/Nefrología C.E.	Urocultivo	<i>A. haemolyticus</i>	11/10/2013	1	0.25	Sensible a todos los antibióticos probados	<i>bla</i> _{OXA-214}
AE12	UCI	Hemocultivo	<i>A.baumannii</i>	20/07/2016	<0.25	<0.25	CTX*, CRO*	<i>bla</i> _{OXA-51}
AE13	DPCA	Sec. Sitio de salida de Catéter	<i>A.pittii</i>	26/07/2016	<0.25	<0.25	CTX*, CRO*, SXT	NP
AE14	Nefrología H.	Herida	<i>A. baumannii</i>	03/08/2016	128	32	PIP, SAM*, TZP, TIM, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM, GN, AN, TE, CIP, LVX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24}
AE15	UCI	LBA	<i>A. baumannii</i>	04/08/2016	<0.25	0.5	CTX*, CRO*	NP
AE16	Cirugía H.	Hemocultivo	<i>A.baumannii</i>	05/08/2016	128	128	PIP, TZP, TIM, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM, GN, AN, CIP, LVX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24}
AE17	UMF	Exudado Vaginal	<i>A.haemolyticus</i>	18/08/2016	1	4	PIP, CRO*	<i>bla</i> _{OXA-214}
AE18	UCI	ND	<i>A.haemolyticus</i>	05/09/2016	0.5	1	Sensible a todos los antibióticos probados	NP
AE19	UMF/Ortopedia	Herida	<i>A.baumannii</i>	12/01/2017	128	64	PIP, TZP, TIM, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM, *GN, AN, *TE, CIP, LVX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24}
AE20	UCIN	ND	+	14/06/2016	ND	ND	SXT*	<i>bla</i> _{OXA-51}
AE21	Ginecología	Exudado Vaginal	+	30/06/2016	ND	ND	Sensible a todos los antibióticos probados	NP
AE22	UCI	Urocultivo	+	02/10/2017	>128	512	PIP, TIC, SAM, TZP, TIM, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM, GN, AN*, TE, CIP, LVX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-24}
AE23	UCI/Neurología	Urocultivo	+	08/01/2018	>128	512	PIP, TIC, SAM, TZP, TIM, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM, GN, AN*, TE, CIP, LVX, SXT	<i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-24}

* Sensibilidad intermedia. +,amplificado positivo aún no secuenciado. **ND**: no determinado, **NP**: no porta, **C.E.:** Consulta externa; **UCI**: Unidad de cuidados intensivos, **UMF**: Unidad de medicina familiar; **UCIN**: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal, **MI**: Medicina interna; **DPCA**: Diálisis peritoneal continua ambulatoria; **LBA**: Lavado bronquio alveolar. **PIP**: Piperacilina, **TIC**: Ticarcilina, **SAM**: Ampicilina/Sulbactam, **TZP**: Piperacilina/Tazobactam, **TIM**: Ticarcilina/Ác. Clavulánico, **CAZ**: Ceftazidima, **FEP**: Cefepime, **CTX**: Cefotaxima, **CRO**: Ceftriaxona, **IPM**: Imipenem, **MEM**: Meropenem, **GN**: Gentamicina, **AN**: Amikacina, **TE**: Tetraciclina, **CIP**: Ciprofloxacino, **LVX**: Levofloxacino, **SXT**: Trimetoprim/Sulfametoxazol. **CLSI, 2018.**

8. DISCUSIÓN

El género *Acinetobacter* comprende un grupo versátil de bacterias Gramnegativas No fermentadoras que recientemente se han convertido en un foco de atención para científicos y clínicos, tanto en términos de sus propiedades biológicas fundamentales como de su potencial patogénico. Los progresos recientes en el campo de la biología molecular han permitido una comprensión más detallada de muchos de los aspectos importantes de los miembros de este género, incluida su diversidad y taxonomía, importancia clínica, mecanismos de virulencia, genómica, epidemiología y resistencia a los antibióticos (Visca *et al.*, 2011).

En este trabajo se estudiaron cepas clínicas de *Acinetobacter spp.* del Hospital para el Niño Poblano, de los cuales el 66% fueron aisladas de líquido de diálisis peritoneal principalmente del servicio de Medicina Interna 51%, seguido del área de Urgencias con un 25%. Estos datos contrastan con lo informado por (Morfín-Otero *et al.*, 2013), donde el primer sitio de aislamiento fueron secreciones 50%, seguido de catéter vascular y fuentes respiratorias de la unidad de cuidados intensivos en la sala de pediatría. Es importante señalar que del HNP únicamente se reciben cepas de la sección de bacteriología donde se manejan líquidos y secreciones, por lo que sería interesante recabar muestras de otras secciones para ampliar el estudio en un futuro.

La clasificación a nivel de especie del género *Acinetobacter* es complicada si únicamente se emplean métodos bioquímicos tradicionales, debido a la baja discriminación que proporcionan, por lo que se requieren técnicas moleculares para lograr con certeza la identificación. Desafortunadamente, no todos los hospitales mexicanos tienen acceso a técnicas de tipificación molecular en los laboratorios de diagnóstico de rutina, lo que lleva a la pérdida de información epidemiológica importante sobre enfermedades infecciosas causadas por otras especies emergentes diferentes a las del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Turton *et al.*, 2010).

A. baumannii es uno de los principales agentes etiológicos que causan infecciones asociadas a la atención de la salud a nivel mundial y México no es la excepción, donde varios informes indican que *A. baumannii* es el microorganismo más

frecuente en infecciones de pacientes inmunodeprimidos ingresados en unidades de cuidados intensivos (Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015; Garza-González *et al.*, 2010; Morfín-Otero *et al.*, 2013). Es importante mencionar que los métodos de identificación que han usado en estos estudios se basan únicamente en el metabolismo de la bacteria como Vitek 2 y API 20E.

En esta investigación se informó la presencia de especies consideradas ambientales "emergentes" que causan infecciones en pacientes pediátricos. Nuestros hallazgos muestran que la especie no-*baumanni* que prevaleció en el hospital infantil fue *A. haemolyticus* representando un 50% de los aislados tipificados. En otros países como China, Alemania, Portugal e India hay informes que revelan resultados contrarios, donde los aislamientos de esta especie se han descrito en menor proporción (Grosso *et al.*, 2012; Schleicher *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*, 2014). También se encontraron otras especies como *A. oleivorans*, *A. venetianus*, *A. grimontii*, *A. indicus*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. ursingii*, que son bacterias con una tasa de aislamiento baja de muestras clínicas, que se encuentran principalmente en el ambiente, agua, arcilla y suelo (Al Atrouni *et al.*, 2016). Este trabajo es el primer reporte de un hospital mexicano donde predominaron especies fuera del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumanni* (Acb).

Aunque la mayoría de las cepas de *A. haemolyticus* estudiadas fueron principalmente sensibles a los antibióticos betalactámicos, la presencia de betalactamasas intrínsecas es el mecanismo más frecuente para que las bacterias sean resistentes. Estos microorganismos son potenciales reservorios y diseminadores de genes de resistencia, particularmente en entornos hospitalarios. Nuestras cepas fueron portadoras de genes codificantes de betalactamasas de la familia *bla*_{OXA-214}, gen que se ha localizado previamente en el cromosoma de esta especie (Figueiredo *et al.*, 2012). Es importante destacar que en este trabajo encontramos una nueva variante *bla*_{OXA-575}, con un 97.85% de identidad con *bla*_{OXA-214}; sin embargo, sólo una de las cepas que presenta la nueva variante mostró un alto valor de CMI para las cefalosporinas, en la que podrían estar además involucrados otros mecanismos de resistencia.

Por otro lado, también se encontraron variantes de la familia de *bla*_{OXA-214} que están truncadas por la secuencia de inserción IS*Aba125*. Se ha reportado en otros estudios donde la secuencia de inserción conforma un transposón llamado Tn125, que moviliza la metalo-beta-lactamasa NDM-1 en diferentes géneros y especies bacterianas (Marquez-Ortiz *et al.*, 2017).

Además, se detectaron dos cepas de *A. haemolyticus* portadoras de *bla*_{NDM-1} (AN54 y AN57). Esta enzima ha surgido en todo el mundo y confiere una amplia gama de resistencia a los betalactámicos, incluidos cefalosporinas de última generación y carbapenémicos, por lo que su detección temprana es extremadamente importante para evitar su diseminación en los hospitales (Koh *et al.*, 2010).

Asimismo, las cepas estudiadas portan una nueva variante *bla*_{TEM-229}, que deriva de *bla*_{TEM-116} (99,65% de identidad) que se ha encontrado en otras especies no-*baumannii* y otros géneros bacterianos como *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii* y *Shigella flexneri*, lo que sugiere que posiblemente esta betalactamasa sea transferida de manera horizontal (Forcella *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2008; Lahlaoui *et al.*, 2011).

Con respecto a la resistencia a aminoglucósidos, en los aislamientos estudiados aquí se identificaron tres nuevas variantes de N-acetiltransferasas de la familia AAC(6')-I. Se sabe que las cepas de *A. haemolyticus* portan en el cromosoma los genes que codifican este tipo de enzimas modificadoras de aminoglucósidos confiriéndoles resistencia a amikacina, netilmicina, tobramicina y gentamicina (Doi *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 1993; Stogios *et al.*, 2017).

Las cepas tipificadas como miembros del complejo *Acb* no mostraron resistencia franca a los antibióticos. Únicamente cinco cepas de *A. baumannii* de la unidad de quemados, que es un edificio independiente del hospital, resultaron ser resistentes a múltiples fármacos, incluyendo carbapenémicos y además comparten el mismo perfil plasmídico. Estas cinco cepas portan *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23} que se encuentran con frecuencia en el cromosoma y en plásmidos. Se ha reportado estos genes pueden ser sobreexpresados por secuencias de inserción lo que les confiere alta resistencia a los carbapenémicos (Chagas *et al.*, 2014; Wibberg *et al.*, 2018). Sin embargo, en este trabajo no se encontraron secuencias de inserción río arriba de

las betalactamasas. La presencia de cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en la unidad de quemados se produjo en un corto tiempo, y no se identificaron más cepas con las mismas características fenotípicas, genotípicas y plasmídicas, lo que podría sugerir una diseminación local en esa área posiblemente por contaminación cruzada.

En las cepas de *A. baumannii* se han estudiado otros mecanismos implicados en la resistencia a los antibióticos, uno de ellos son las bombas de eflujo, principalmente las del sistema RND, específicamente AdeABC, AdeFGH y AdeIJK, cuya sobreexpresión se ha relacionado con la resistencia de diferentes compuestos (Lin *et al.*, 2017). No obstante, no se han realizado estudios experimentales de bombas de eflujo en especies no-*baumannii* (Espinal *et al.*, 2011).

Los genes que codifican la bomba de expulsión AdeABC están organizados en el operón (*adeABC*) con sus genes reguladores, *adeS* y *adeR*, que conforman un sistema de regulación de doble componente. Estos genes regulan la expresión de la bomba en respuesta a los estímulos del entorno celular (antibióticos); este tipo de expresión es llamado inductivo (Wieczorek *et al.*, 2008).

AdeIJK codificada por el operón *adeIJK* es el segundo sistema de flujo de salida RND descrito en *A. baumannii* (Damier-Piolle *et al.*, 2008), que contribuye a la resistencia a los betalactámicos, como ticarcilina, cefalosporinas, aztreonam, fluoroquinolonas, tetraciclinas, tigeciclina, lincosamidas, rifampicina, cloranfenicol; sin embargo, los aminoglucósidos no son sustratos para esta bomba (Coyne *et al.*, 2010).

Nuestros resultados mostraron que en las cepas *A. haemolyticus* y *A. baumannii* portadores de betalactamasas tipo OXA, hubo una disminución de 2, 4 o incluso 6 veces el valor de CMI para CTX en presencia de EPI. Lo que sugiere que las bombas de eflujo también participan en la resistencia a CTX en ambas especies. Además, observamos la participación de bombas de expulsión en la resistencia a AN, incluso cuando las cepas portaban AAC(6')-I. Trabajos anteriores afirman que existe una participación simultánea de las bombas de expulsión con genes de resistencia a betalactámicos y aminoglucósidos en cepas de *A. baumannii* (Coyne *et al.*, 2011; Ostadi Yalda *et al.*, 2019). Por lo tanto, se sugiere que en algunas cepas

clínicas de *A. haemolyticus* incluídas en este trabajo, se este realizando la expulsión de antibióticos mediada por bombas.

Interesantemente, en las cepas *A. haemolyticus* AN54 y AN57 que tienen NDM-1 y los *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos con OXA-23, no exhibieron disminución en los valores de CMI para MEM en presencia de EPI. Esto indica que la actividad de las enzimas que portan podría ser suficiente para los niveles de resistencia a los carbapenémicos que presentan (Rumbo *et al.*, 2013).

Únicamente dos cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos y una *A. haemolyticus* presentaron una disminución del valor de CMI a CIP en presencia de EPI. Esto probablemente sugiere la participación de sistemas de expulsión; sin embargo, se sabe que el mecanismo de resistencia a las quinolonas se debe principalmente a mutaciones en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) en los genes *gyrA* y *parC* en cepas de *A. baumannii* y miembros del complejo Acb (Gu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2015). Concerniente a ello, aunque el porcentaje de identidad entre las cepas AN3 y AN4 de *A. haemolyticus* resistentes a CIP y las cepas de *A. baumannii* que se usaron como referencia fue mayor al 90%, no se puede llegar a una conclusión de si las mutaciones encontradas aquí contribuyen a la resistencia a este antibiótico, se requieren otro tipo de experimentos para comprobarlo.

La caracterización completa de un microorganismo en el laboratorio constituye un proceso costoso y laborioso que consume tiempo. Con el surgimiento de las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) se ha abierto un nuevo camino en este campo, debido a que permiten el procesamiento masivo y en paralelo de las muestras, reducen notablemente los costos y el tiempo para obtener la secuencia genómica, además de que motiva la colaboración entre grupos multidisciplinarios de investigación para abordar el procesamiento y la interpretación de los resultados (Aguilar-Bultet *et al.*, 2015).

En este trabajo se consiguió secuenciar el genoma completo de la cepa *A. haemolyticus* AN54 portadora de *bla*_{NDM-1}. La cepa acarrea diferentes genes de resistencia, como *bla*_{OXA-265}, en el cromosoma (Figueiredo *et al.*, 2012), también

alberga genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos que le confieren resistencia a amikacina, como *aac(6')-I_g* y *aphA6*, esta última es asociada con la presencia de *bla_{NDM-1}* (Fu *et al.*, 2012).

En cuanto a sus mecanismos de expulsión, la cepa *A. haemolyticus* AN54 contiene homólogos de la bomba AdeABC y sus reguladores AdeS y AdeR; únicamente se encontraron las unidades AdeJ y AdeK de la bomba AdeIJK, resultado se ha descrito en trabajos previos de *A. baumannii* donde mencionan que la bacteria puede intercambiar AdeJ por la subunidad homóloga de la bomba AdeABC para que esta sea funcional (Damier-Piolle *et al.*, 2008).

También se usó EPI para evaluar el papel de la bomba de expulsión en la resistencia a los antibióticos. Los resultados sugieren que la bomba sólo participa en conferir resistencia a amikacina, como se muestra por una disminución de CMI (64 a 32 µg/mL). La cepa no mostró una disminución en la CMI para CTX y MEM, como se mencionó anteriormente, posiblemente por tener *bla_{NDM-1}* (Rumbo *et al.*, 2013).

La presencia de *bla_{NDM-1}* en una especie de origen ambiental no-*baumannii* como *A. haemolyticus* es relevante desde el punto de vista médico y epidemiológico. Esto es especialmente cierto considerando la falta de tratamiento exitoso para pacientes con algunas enfermedades subyacentes y la facilidad de diseminación de *bla_{NDM-1}* a través de eventos de recombinación complejos mediados por secuencias de inserción, transposones y plásmidos, como se ha informado en estudios anteriores (Al Atrouni *et al.*, 2016; Marquez-Ortiz *et al.*, 2017; Nordmann *et al.*, 2011). La cepa *A. haemolyticus* AN54 alberga *bla_{NDM-1}* dentro de un transposón similar a Tn125 y que esta presente en un plásmido muy similar a pNDM-BJ02 de *A. lwoffii*, que se describió en China (Hu, *et al.*, 2012).

El llamado “backbone” de los plásmidos que transportan *bla_{NDM-1}* entre *Acinetobacter* spp. está relativamente conservado; sin embargo, una diferencia encontrada en plásmido pAhaeAN54e es la presencia de IS91. Este gen se designa como ISCR y una de sus funciones es la movilización de secuencias adicionales río arriba del gen de transposasa (Toleman *et al.*, 2006; Toleman *et al.*, 2010). La segunda diferencia es la inserción de siete genes que codifican proteínas hipotéticas

en la región de conjugación putativa; la función de estas proteínas es aún desconocida.

Actualmente, no existen metodologías para caracterizar este tipo de replicón, debido a la ausencia de una proteína Rep típica como la que presentan los plásmidos de Enterobacterias, lo que indica que estos plásmidos poseen un sistema de replicación aún no estudiado; de modo que abre un tema interesante por esclarecer.

Por otra parte, no se obtuvieron transconjugantes ni transformantes bajo las condiciones probadas; sin embargo, no podemos excluir algunos mecanismos alternativos de transferencia de plásmidos, como se informó en otros estudios de *Acinetobacter* spp. con *bla*_{NDM-1} (Brovedan et al., 2015; Fu et al., 2012b; Montaña et al., 2016; Pasteran et al., 2014). Por lo que sería interesante que se realicen los experimentos variando las condiciones y usando otras cepas receptoras del mismo o de diferente género bacteriano.

Recientemente, Duran-Bedolla et al., 2018 describió parcialmente el contexto genético de *bla*_{NDM-1} en cepas de *Acinetobacter* spp., e incluyeron a la cepa *A. haemolyticus* 10256 aislada en un área geográfica diferente de México. El plásmido pAhaeAN54e mostró diferencias específicas en comparación con el plásmido de *A. haemolyticus* 10256 (55 kpb). Estas diferencias incluyeron, tamaño (45,4 kpb), ausencia de la secuencia IS*Aba125* en el extremo 3' y presencia de genes que codifican proteínas hipotéticas a lo largo de la estructura del plásmido e IS91 en lugar de IS*CR27*. Estos resultados sugieren que el contexto genético de *bla*_{NDM-1} en *A. haemolyticus* está parcialmente conservado (Fu et al., 2015; Jones et al., 2015).

También se muestra que el plásmido pAhaeAN54e tiene una alta similitud con el plásmido p06-1619-NDM de *Providencia rettgeri*, y como lo señalaron Marquez-Ortiz y colaboradores en 2017, las similitudes entre los plásmidos análogos a pNDM-BJ01 y los plásmidos de *P. rettgeri* pueden ser el resultado de eventos de recombinación que conducen a un plásmido quimérico que puede transmitirse y replicarse entre aislados de Enterobacterias y *Acinetobacter* (Barrios et al., 2013; Marquez-Ortiz et al., 2017).

Otro mecanismo de resistencia a carbapenémicos son alteraciones en la porina CarO. Estudiamos la porina de la cepa AN54, evidenciando que existe un gran polimorfismo entre las especies del género *Acinetobacter* (Mussi *et al.*, 2011) y si bien se ha reportado que la pérdida o disrupción de la porina por secuencias de inserción se asocia a la resistencia a imipenem, en este caso no se podría asegurar ya que la cepa porta el gen *bla*_{NDM-1}, que por sí solo tiene un amplio espectro de hidrólisis a carbapenémicos. Este resultado coincide con la investigación realizada por Fonseca *et al.*, 2013 en aislados brasileños donde atribuyen principalmente la resistencia a carbapenémicos a *bla*_{OXA-23} y que la pérdida de la porina CarO tiene un papel menor en su fenotipo. Caso contrario son los hallazgos de Catel-Ferreira y colaboradores donde se hace mención que la disminución en la expresión de CarO reduciría aún más la susceptibilidad de *A. baumannii* a imipenem (Catel-Ferreira *et al.*, 2011). Otro resultado interesante fue que la porina CarO presenta mayor similitud entre cepas de la misma especie, no obstante, se requieren más estudios para corroborar su participación en la resistencia a carbapenémicos y cefalosporinas sobre todo en cepas no-*baumannii*.

Por otro lado, también se obtuvo la secuencia parcial del genoma de la cepa *A. baumannii* AN71, que se había clasificado inicialmente como *A. haemolyticus*, por lo que se piensa que posiblemente hayan podido coexistir ambas especies y que al realizar la identidad promedio de nucleótidos (ANI) que permite conocer la similitud entre dos genomas, se confirmó que se logró secuenciar a la especie *A. baumannii* (99.55% de identidad con la cepa de referencia *A. baumannii* ACICU).

El fenotipo que presenta la cepa refleja que posee diversos mecanismos implicados en la resistencia a antibióticos, entre los que se encuentran las bombas de expulsión de las familias MFS (TetB) que le confiere resistencia a tetraciclinas, SMR (AbeS, AdeM) que proveen resistencia a macrólidos, aminocumarina, fluoroquinolonas, acridina, triclosan y RND (AdeABC, AdeIJK) que se mencionó anteriormente es la más estudiada en cepas de *A. baumannii* (Coyne *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos con EPI (disminución de CMI de 2-3 veces para CTX y MEM) van acorde a los reportados en otros estudios donde se aprecia una franca participación de las bombas RND en la expulsión de antibióticos betalactámicos (Coyne *et al.*, 2010; Magnet *et al.*, 2001).

La porina CarO se asemeja a las reportadas en la especie *baumannii*, en el caso de AN71 fue el alelo CarO3 y si la comparamos con la porina CarO de la cepa *A. haemolyticus* AN54 se reafirma que existe un polimorfismo significativo entre las especies del mismo género, además de que aún no está claro el papel de las variantes alélicas de la porina como responsable de la sensibilidad reducida a carbapenémicos (Mussi *et al.*, 2011; Zahn *et al.*, 2015).

Otro mecanismo de resistencia encontrado fue la betalactamasa ADC-56, que es una cefalosporinasa cromosómica tipo AmpC que le confiere resistencia a cefepime (Tian *et al.*, 2011), la oxacilinas OXA-66 que ha sido encontrada flanqueada río arriba por IS*Aba1* en cepas *A. baumannii* aisladas de animales de compañía (Ewers *et al.*, 2017) y TEM-1D reportada en cepas de *A. baumannii*, *E. coli* y *K. pneumoniae* (Heng *et al.*, 2018; Lv *et al.*, 2019).

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos que acarrea la cepa como APH(3'')-I, APH(6)-I y la bomba de expulsión TetB se describieron en el mismo arreglo genético por Lv *et al.*, 2019 en una cepa *A. baumannii* ST195 (CC92) aislada de una paciente con neumonía neonatal en China.

Por otra parte, los integrones son pieza clave para la diseminación de genes de resistencia, siendo los de clase 1 los más frecuentes (Sabaté *et al.*, 2002). AN71 es portadora del integron In439 comúnmente localizado en el cromosoma de cepas *A. baumannii* (Martinez *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2014); el integron clásico se conforma de los casetes génicos *aacA4'-8* y *aadA1a* que confieren resistencia a gentamicina, amikacina, kanamicina, estreptomycin y espectinomicina, en conjunto con *catB8* que le confiere resistencia a cloranfenicol (Gordon *et al.*, 2010)

La cepa AN71 pertenece al ST369 del CC92, mismo que se ha reportado en cepas *A. baumannii* portadoras de OXA-72 y que han sido causantes de brotes en hospitales de la ciudad de México, San Luis Potosí y Monterrey; sin embargo, también se ha observado la propagación de la betalactamasa hacia diversas clonas con ST distintos al que aquí se reporta, como son ST777 y ST417 (San Luis Potosí), ST136 y ST934 (Guadalajara, Jalisco), ST473 (Torreón, Coahuila).

Por otro lado, la betalactamasa OXA-72 se ha informado en aislamientos de *A. baumannii* que se obtuvieron de otros reservorios como ganado, animales de compañía y medio ambiente en América del Sur, Asia meridional y Europa del Este (Jia *et al.*, 2019). Estos hallazgos apuntan a que la movilización de OXA-72 no está restringida a un sólo ST y que es un mecanismo de resistencia adquirido (Alcántar-Curiel *et al.*, 2019; Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015; Tamayo-Legorreta *et al.*, 2016).

Los plásmidos que movilizan OXA-72 tienen una estructura similar, como se demostró en la comparación del plásmido pAbaAN71 con los plásmidos pAba9210a, pAba10042a, pAba5845a que fueron identificados en cepas clínicas de las ciudades de Guadalajara, Torreón y San Luis Potosí respectivamente (Datos obtenidos directamente del GenBank-NCBI).

pAbaAN71 consta de 13 marcos de lectura, de los cuales 6 codifican para proteínas hipotéticas de función desconocida, dispone de una proteína de replicación RepA y una relaxasa tipo MobA/MobL, lo que lo hace eventualmente tipificable por los métodos de Alvarado *et al.*, 2012 y Bertini *et al.*, 2010; sin embargo, la caracterización de estas proteínas se realizará en estudios posteriores. Se propone que la proteína unidora de ADN así como la proteína con dominio hélice-vuelta-hélice pueden estar implicadas en el mantenimiento del plásmido (Jia *et al.*, 2019).

En los cuatro plásmidos comparados, la betalactamasa OXA-72 se encuentra flanqueada por IS*Aba48*, interesantemente poseen una región delimitada por sitios de recombinación XerC/XerD con su proteína accesoria Arc, lo que sugiere que esta zona puede ser intercambiada e insertada en diferentes sentidos y no se sabe si la inversión pudiera tener alguna repercusión en la función del plásmido o directamente para la bacteria (Merino *et al.*, 2010).

9. CONCLUSIONES

Por primera vez se reporta en un hospital (HNP) una mayor presencia de *A. haemolyticus* causantes de infecciones, a diferencia de otros hospitales donde *A. baumannii* es el principal agente causal. Estas cepas de *A. haemolyticus* portaron nuevas variantes de betalactamasas (OXA-575 y TEM-229) y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AAC(6')-Iga, AAC(6')-Igb y AAC(6')-Igc) y la participación de bombas de eflujo en la resistencia a antibióticos, lo cual no había sido reportado en esta especie. Además, se reporta una cepa de *A. haemolyticus* portadora de *bla*_{NDM-1} en un nuevo plásmido. Este plásmido podría constituir un mecanismo de diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos entre diversos géneros y especies bacterianas. Al realizar la secuenciación masiva de una cepa de *A. baumannii* XDR, observamos que porta un gran número de genes de resistencia a antibióticos, bombas de expulsión, además de un plásmido portador de *bla*_{OXA-72}, similar a los reportados en *A. baumannii* en México. Por otro lado, en el H.R. I.S.S.S.T.E., se encontraron cepas de *A. baumannii* XDR, que fueron parcialmente estudiadas y que son portadoras de betalactamasas *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-24}. Los hallazgos reportados en este estudio proporcionan información sobre la diversidad de especies de *Acinetobacter* y de los mecanismos de resistencia a antibióticos que pueden presentarse en los diferentes hospitales, demostrando que la vigilancia de la resistencia debe realizarse individualmente en cada unidad hospitalaria.

10. PERSPECTIVAS

- Continuar con el monitoreo epidemiológico y molecular en los hospitales poblanos para vigilar la aparición de especies no-*baumannii* emergentes causantes de infecciones que puedan ser diseminadoras de genes de resistencia a antibióticos.
- Emplear la genómica comparativa para el estudio de las cepas *A. haemolyticus* que fueron secuenciadas, y compararlas con cepas de la misma especie aisladas de diferentes ambientes.
- Determinar la función de las proteínas hipotéticas en el plásmido pAhaeAN54e que acarrea *bla*_{NDM-1}.
- Investigar la correlación de la resistencia a quinolonas y las mutaciones en *gyrA* y *parC* de las cepas *A. haemolyticus*.
- Investigar la participación de las mutaciones en la porina CarO en la resistencia a carbapenémicos de las cepas de *A. haemolyticus*.
- Secuenciar las betalactamasas tipo OXA-51, OXA-24 y OXA-23 que portan las cepas *A. baumannii* MDR y resistentes a carbapenémicos de la unidad pediátrica de quemados del HNP y del H. R. I.S.S.S.T.E.; así como caracterizar sus plásmidos.
- Determinar la relación clonal de las cepas *A. baumannii* del H.R. I.S.S.S.T.E. Puebla.
- Buscar otros mecanismos de resistencia (Betalactamasas clase A y B, bombas de expulsión, porina CarO y mutaciones en *gyrA* y *parC*) a antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas en las cepas *A. baumannii* MDR y resistentes a carbapenémicos del H. R. I.S.S.S.T.E Puebla.
- Buscar secuencias de inserción IS*Aba* que pudieran estar sobre expresando a las betalactamasas tipo OXA en las cepas del H.R.I.S.S.S.T.E.
- Investigar diferentes mecanismos de resistencia en las cepas no-*baumannii* encontradas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaron, S.D., Ferris, W., Henry, D.A., Speert, D.P., Macdonald, N.E., (2000). Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1206–12.
- Aguilar-Bultet, L., Falquet, L., (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev. Salud Anim.* 37-2, 25-132.
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., Kempf, M., (2016). Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Front. Microbiol.* 7, 49.
- Alcántar-Curiel, M.D., García-Torres, L.F., González-Chávez, M.I., Morfín-Otero, R., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M.D., Fernández-Vázquez, J.L., Giono-Cerezo, S., Rodríguez-Noriega, E., Santos-Preciado, J.I., (2014). Molecular Mechanisms Associated with Nosocomial Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico. *Arch. Med. Res.* 45, 553–560.
- Alcántar-Curiel, M.D., Rosales-Reyes, R., Jarillo-Quijada, M.D., Gayosso-Vázquez, C., Fernández-Vázquez, J.L., Toledano-Tableros, J.E., Giono-Cerezo, S., Garza-Villafuerte, P., López-Huerta, A., Vences-Vences, D., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., López-Álvarez, M. del R., Espinosa-Sotero, M. del C., Santos-Preciado, J.I., (2019). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Three Tertiary Care Hospitals in Mexico: Virulence Profiles, Innate Immune Response and Clonal Dissemination. *Front. Microbiol.* 10, 2116.
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One* 7, e40438.
- Ardebili, A., Rastegar Lari, A., Beheshti, M., Rastegar Lari, E., (2015). Association between mutations in *gyrA* and *parC* genes of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and ciprofloxacin resistance. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(6), 623–626.
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Rojas-Moreno, T., Garza-Gonzalez, E., Llaca-Diaz, J.M., Camacho-Ortiz, A., Guzman-Lopez, S., Silva-Sanchez, J., (2013). Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1934–1936.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S., Casellas, J.M., (1996). Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 509–13.
- Bello-López, M.E., (2015). Tesis de Maestría. Estudio molecular de la resistencia a los antibióticos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de Infecciones Nosocomiales. Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E., Pitt, T.L., (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 42, 201–4.
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P.D., Villa, L., Nordmann, P., Carattoli, A., (2010). Characterization and PCR-Based Replicon Typing of Resistance Plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4168–4177.
- Bhattacharya, M., Toth, M., Antunes, N.T., Smith, C.A., Vakulenko, S.B., (2014). Structure of the extended-spectrum class C β -lactamase ADC-1 from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 70, 760–71.
- Bocanegra-Ibarias, P., Peña-López, C., Camacho-Ortiz, A., Llaca-Díaz, J., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., Garza-Ramos, U., Rodríguez-Flores, A.M., Garza-González, E., (2015). Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 309–313.
- Bogaerts, P., Naas, T., El Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., Huang, T.-D., Lissior, B., Nordmann, P., Glupczynski, Y., (2010). GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4872–8.
- Bonnin, R.A., Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P., (2012). Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1419–21.
- Brovedan, M., Marchiaro, P.M., Morán-Barrio, J., Cameranesi, M., Cera, G., Rinaudo, M., Viale, A.M., Limansky, A.S., (2015). Complete Sequence of a bla(NDM-1)-Harboring Plasmid in an *Acinetobacter bereziniae* Clinical Strain Isolated in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6667–9.
- Brown, S., Amyes, S., (2006.) OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1–3.
- Bryant, J., Chewapreecha, C., Bentley, S.D., (2012). Developing insights into the mechanisms of evolution of bacterial pathogens from whole-genome sequences. *Future Microbiol.* 7, 1283–1296.
- Catel-Ferreira, M., Coadou, G., Molle, V., Mugnier, P., Nordmann, P., Siroy, A., Jouenne, T., Dé, E., (2011). Structure–function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2053–2056.
- Chagas, T.P.G., Carvalho, K.R., de Oliveira Santos, I.C., Carvalho-Assef, A.P.D.A., Asensi, M.D., (2014). Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79, 468–472.
- Cho, Y.J., Moon, D.C., Jin, J.S., Choi, C.H., Lee, Y.C., Lee, J.C., (2009). Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of armA in *Acinetobacter baumannii* sequence group 1 in Korean hospitals. *Diagn.*

- Microbiol. Infect. Dis. 64, 185–90.
- Chu, Y.W., Chau, S.L., Houang, E.T.S., (2006). Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. J. Med. Microbiol. 55, 477–8.
- Cortés, C.G., (2016). Tesis Doctoral. Caracterización de la resistencia antimicrobiana y tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México. Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Coyne, S., Courvalin, P., Périchon, B., (2011). Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 947–953.
- Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P., Périchon, B., (2010). Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 333–40.
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T., Courvalin, P., (2008). AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 557–62.
- Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D., Akalin, H.E., Livermore, D.M., (1995). Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 35, 281–294.
- Diancourt, L., Passet, V., Nemeč, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S., (2010). The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. PLoS One 5, e10034.
- Doi, Y., Wachino, J.-I., Yamane, K., Shibata, N., Yagi, T., Shibayama, K., Kato, H., Arakawa, Y., (2004). Spread of novel aminoglycoside resistance gene aac(6')-Iad among *Acinetobacter* clinical isolates in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2075–80.
- Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., Benade, S., (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. Microbes Environ. 26, 101–112.
- Duran-Bedolla, J., Bocanegra-Ibarias, P., Silva-Sanchez, J., Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Hernández-Castro, R., Lozano, L., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., (2018). Genetic characterization of multiple NDM-1-producing clinical isolates in Mexico. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 94, 195-198
- Durmaz, R., Otlu, B., Koksall, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y., Aktas, E., Gursoy, N.C., Caliskan, A., (2009.) The Optimization of a Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for the Typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp, Jpn. J. Infect. Dis. 62 (5), 372-377.
- Espinal, P., Roca, I., Vila, J., (2011). Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non- *baumannii* *Acinetobacter*. Future Microbiol. 6, 495–511.

- Esterly, J., Richardson, C.L., Eltoukhy, N.S., Qi, C., Scheetz, M.H., (2011). Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Ann. Pharmacother.* 45(2), 218–228.
- Ewers, C., Klotz, P., Leidner, U., Stamm, I., Prenger-Berninghoff, E., Göttig, S., Semmler, T., Scheufen, S., (2017). OXA-23 and ISAb₁–OXA-66 class D β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 37–44.
- Figueiredo, S., Bonnin, R.A., Poirel, L., Duranteau, J., Nordmann, P., (2012). Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 907–913.
- Flores-Treviño, S., Gutiérrez-Ferman, J.L., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Estrada-Rivadeneira, D., Rivas-Morales, C., Llaca-Díaz, J.M., Camacho-Ortiz, A., Mendoza-Olazarán, S., Garza-González, E., (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *J. Med. Microbiol.* 63, 1524–30.
- Fonseca, E., Scheidegger, E., Freitas, F.S., Cipriano, R., Vicente, A.C.P., (2013). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*_{OXA-23} gene. *BMC Microbiol.* 13, 245.
- Forcella, C., Pellegrini, C., Celenza, G., Segatore, B., Calabrese, R., Tavío, M.M., Amicosante, G., Perilli, M., (2010). *QnrB9* in Association with TEM-116 Extended-Spectrum Beta-Lactamase in *Citrobacter freundii* Isolated from Sewage Effluent: First Report from Italy. *J. Chemother.* 22, 243–245.
- Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J.-M., (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2, e7.
- Fu, Y., Du, X., Ji, J., Chen, Y., Jiang, Y., Yu, Y., (2012). Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla*_{NDM-1} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2114–2122.
- Fu, Y., Liu, L., Li, X., Chen, Y., Jiang, Y., Wang, Y., Yu, Y., Xie, X., (2015). Spread of a common *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. *Infect. Genet. Evol.* 32, 30–33.
- Garza-González, E., Llaca-Díaz, J.M., Bosques-Padilla, F.J., González, G.M., (2010). Prevalence of multidrug-resistant bacteria at a tertiary-care teaching hospital in Mexico: Special focus on *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy* 56, 275–279.
- Giamarellou, H., Antoniadou, A., Kanellakopoulou, K., (2008). *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 106–119.
- Glupczynski, Y., Bogaerts, P., Deplano, A., Berhin, C., Huang, T.-D., Van Eldere, J., Rodríguez-Villalobos, H., (2010). Detection and characterization of class A

- extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 866–71.
- Gómez, M.J., (2017). Tesis de Maestría. Caracterización parcial de plásmidos portadores de genes que codifican para carbapenemasas de *Pseudomonas aeruginosa*. Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Gonzalez-Villoria, A.M., Valverde-Garduno, V., (2016). Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. *J. Pathog.* 2016, 1–10.
- Gonzalez, G., Sossa, K., Bello, H., Dominguez, M., Mella, S., Zemelman, R., (1998). Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 125–128.
- Gordon, N.C., Wareham, D.W., (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 219–226.
- Grosso, F., Quinteira, S., Poirel, L., Novais, Â., Peixe, L., (2012). Role of Common blaOXA-24/OXA-40-Carrying Platforms and Plasmids in the Spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* Species Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3969–3972.
- Gu, D., Hu, Y., Zhou, H., Zhang, R., Chen, G.-X., (2015). Substitutions of Ser83Leu in GyrA and Ser80Leu in ParC Associated with Quinolone Resistance in *Acinetobacter pittii*. *Microb. Drug Resist.* 21, 345–351.
- Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A.H., Sørensen, S.J., (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3332–7.
- Hamidian, M., Hall, R.M., (2011). AbaR4 replaces AbaR3 in a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate belonging to global clone 1 from an Australian hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2484–91.
- Hamidian, M., Holt, K.E., Pickard, D., Dougan, G., Hall, R.M., (2014). A GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate carrying AbaR3 and the aminoglycoside resistance transposon TnaphA6 in a conjugative plasmid. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 955–8.
- Heng, S.T., Chen, S.L., Wong, J.G.X., Lye, D.C., Ng, T.M., (2018). No association between resistance mutations, empiric antibiotic, and mortality in ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Sci. Rep.* 8, 12785.
- Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H., (2010). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 233–8.
- Hu, H., Hu, Y., Pan, Y., Liang, H., Wang, H., Wang, X., Zhu, B. (2012). Novel plasmid and its variant harboring both a bla_(NDM-1) gene and type IV secretion system in

- clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56(4), 1698–1702.
- Hu, G.-Z., Chen, H.-Y., Si, H.-B., Deng, L.-X., Wei, Z.-Y., Yuan, L., Kuang, X.-H., (2008). Phenotypic and molecular characterization of TEM-116 extended-spectrum beta-lactamase produced by a *Shigella flexneri* clinical isolate from chickens. *FEMS Microbiol. Lett.* 279, 162–166.
- Jeannot, K., Diancourt, L., Vaux, S., Thouverez, M., Ribeiro, A., Coignard, B., Courvalin, P., Brisse, S., (2014). Molecular Epidemiology of Carbapenem Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* in France. *PLoS One* 9, e115452.
- Jia, H., Sun, Q., Ruan, Z., Xie, X., (2019). Characterization of a small plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-72 from community-acquired *Acinetobacter baumannii* sequence type 880 in China. *Infect. Drug Resist.* 12, 1545–1553.
- Jones, L.S., Carvalho, M.J., Toleman, M.A., White, P.L., Connor, T.R., Mushtaq, A., Weeks, J.L., Kumarasamy, K.K., Raven, K.E., Török, M.E., Peacock, S.J., Howe, R.A., Walsh, T.R., (2015). Characterization of plasmids in extensively drug-resistant *Acinetobacter* strains isolated in India and Pakistan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 923–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.03242-14>
- Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., Samuelsen, Ø., (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist. Updat.* 15, 237–247.
- Kaur, A., Singh, S., (2018). Prevalence of Extended Spectrum Betalactamase (ESBL) and Metallobetalactamase (MBL) Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Various Clinical Samples. *J. Pathog.* 2018, 1–7.
- Koh, T.H., Khoo, C.T., Wijaya, L., Leong, H.N., Lo, Y.L., Lim, L.C., Koh, T.Y., (2010). Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect. Dis.*
- Krizova, L., Dijkshoorn, L., Nemec, A., (2011). Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3201–6.
- Kumita, W., Saito, R., Sato, K., Ode, T., Chida, T., Okamura, N., Saito, R., Moriya, K., Koike, K., (2009). Molecular characterizations of carbapenem and ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas putida*. *J. Infect. Chemother.* 15, 6–12.
- La Scola, B., Gundi, V.A.K.B., Khamis, A., Raoult, D., (2006). Sequencing of the rpoB Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. *J. Clin. Microbiol.* 44, 827–832.
- Lahlaoui, H., Moussa, M., Dahmen, S., Omrane, B., (2011). First detection of TEM-116 extended-spectrum β -lactamase in a *Providencia stuartii* isolate from a Tunisian hospital. *Indian J. Med. Microbiol.* 29, 258.
- Lambert, T., Gerbaud, G., Galimand, M., Courvalin, P., (1993). Characterization of

- Acinetobacter haemolyticus aac(6')-Ilg* gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase which modifies amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2093–100.
- Lee, C.-R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., Cha, C.-J., Jeong, B.C., Lee, S.H., (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 55.
- Lee, J.K., Lee, Y.S., Park, Y.K., Kim, B.S., (2005). Mutations in the *gyrA* and *parC* Genes in Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Microbiol. Immunol.* 49, 647–653.
- Lee, Y., Kim, C.-K., Lee, H., Jeong, S.H., Yong, D., Lee, K., (2011). A novel insertion sequence, ISAb10, inserted into ISAb1 adjacent to the *bla_{OXA-23}* gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 361–3.
- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y., Tu, C.-C., Lan, C.-Y., (2017). Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 50, 224–231. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2015.04.004>
- Liu, P.Y.-F., Wu, W.-L., (1997). Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 19–28.
- Liu, Y.-H., Kuo, S.-C., Lee, Y.-T., Chang, I.C.Y., Yang, S.-P., Chen, T.-L., Fung, C.-P., (2012). Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 45, 108–112.
- Llaca-Díaz, J.M., Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Flores, S., Garza-González, E., (2013). One-year surveillance of escape pathogens in an intensive care unit of monterrey, Mexico. *Chemotherapy* 58, 475–481.
- Looney, W.J., Narita, M., Mühlemann, K., (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet. Infect. Dis.* 9, 312–23.
- Lv, W., Zhang, X., Hou, M., Han, D., Li, Y., Xiong, W., (2019). Draft genome sequence of an OXA-23, OXA-66, ADC-25 and TEM-1D co-producing *Acinetobacter baumannii* ST195 isolated from a patient with neonatal pneumonia in China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 16, 1–3.
- Łysakowska, M., Sienkiewicz, M., Denys, A., (2010). *Acinetobacter pneumonia* and *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol.*, 16, 1-2,48–54.
- Macfaddin, J. F., (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Argentina: Editorial Medica Panamericana, S.A.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske,

- C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.
- Magnet, S., Courvalin, P., Lambert, T., (2001). Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454 45, 3375–3380. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3375-3380.2001>
- Mancilla-Rojano, J., Castro-Jaimes, S., Ochoa, S.A., Bobadilla del Valle, M., Luna-Pineda, V.M., Bustos, P., Laris-González, A., Arellano-Galindo, J., Parra-Ortega, I., Hernández-Castro, R., Cevallos, M.A., Xicohtencatl-Cortes, J., Cruz-Córdova, A., (2019). Whole-Genome Sequences of Five *Acinetobacter baumannii* Strains From a Child With Leukemia M2. *Front. Microbiol.* 10, 132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00132>
- Maragakis, L.L., Perl, T.M., (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1254–63.
- Marí-Almirall, M., Cosgaya, C., Higgins, P.G., Van Assche, A., Telli, M., Huys, G., Lievens, B., Seifert, H., Dijkshoorn, L., Roca, I., Vila, J., (2017). MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 210.e1-210.e9.
- Marquez-Ortiz, R.A., Haggerty, L., Olarte, N., Duarte, C., Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J., Castro, B.E., Sim, E.M., Beltran, M., Moncada, M. V., Valderrama, A., Castellanos, J.E., Charles, I.G., Vanegas, N., Escobar-Perez, J., Petty, N.K., (2017). Genomic epidemiology of NDM-1-encoding plasmids in latin American clinical isolates reveals insights into the evolution of multidrug resistance. *Genome Biol. Evol.* 9, 1725–1741.
- Martí, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, Á., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Bou, G., Miguel Cisneros, J., Pachón, J., Martínez-Martínez, L., Vila, J., (2006). Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24, 77–80.
- Martinez, T., Martinez, I., Vazquez, G.J., Aquino, E.E., Robledo, I.E., (2016). Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *J. Med. Microbiol.* 65, 784–92.
- Mateo-Estrada, V., Graña-Miraglia, L., López-Leal, G., Castillo-Ramírez, S., (2019). Phylogenomics Reveals Clear Cases of Misclassification and Genus-Wide Phylogenetic Markers for *Acinetobacter*. *Genome Biol. Evol.* 11, 2531–2541.
- Mehta, Y., Gupta, A., Todi, S., Myatra, S., Samaddar, D.P., Patil, V., Bhattacharya, P.K., Ramasubban, S., (2014). Guidelines for prevention of hospital acquired infections. *Indian J. Crit. Care Med.* 18, 149–63.

- Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Martínez-Reséndez, M.F., Llaca-Díaz, J.M., Pérez-Rodríguez, E., Garza-González, E., (2014). Influence of whole-body washing of critically ill patients with chlorhexidine on *Acinetobacter baumannii* isolates. *Am. J. Infect. Control* 42, 874–878.
- Mercier, J., Levesque, R.C., (1990). Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 beta-lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1577–1583.
- Merino, M., Acosta, † Joshi, Poza, M., Sanz, F., Beceiro, A., Chaves, F., Bou, G., (2010). OXA-24 Carbapenemase Gene Flanked by XerC/XerD-Like Recombination Sites in Different Plasmids from Different *Acinetobacter* Species Isolated during a Nosocomial Outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2724–2727.
- Montaña, S., Cittadini, R., Del Castillo, M., Uong, S., Lazzaro, T., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C., Ramírez, M.S., (2016). Presence of New Delhi metallo- β -lactamase gene (NDM-1) in a clinical isolate of *Acinetobacter junii* in Argentina. *New microbes new Infect.* 11, 43–4.
- Morfín-Otero, R., Alcántar-Curiel, M.D., Rocha, M.J., Alpuche-Aranda, C.M., Santos-Preciado, J.I., Gayosso-Vázquez, C., Araiza-Navarro, J.R., Flores-Vaca, M., Esparza-Ahumada, S., González-Díaz, E., Pérez-Gómez, H.R., Rodríguez-Noriega, E., (2013). *Acinetobacter baumannii* infections in a tertiary care hospital in Mexico over the past 13 years. *Chemotherapy* 59, 57–65.
- Morfín-Otero, R., Tinoco-Favila, J., Sader, H.S., Salcido-Gutierrez, L., Perez-Gomez, H., Gonzalez-Diaz, E., Petersen, L., Rodriguez-Noriega, E., (2012). Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. *BMC Res. Notes* 5, 277.
- Moubareck, C., Brémont, S., (2009). GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(8):3579–3581.
- Mussi, M.A., Limansky, A.S., Relling, V., Ravasi, P., Arakaki, A., Actis, L.A., Viale, A.M., (2011). Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single *carO* gene, encoding a major outer membrane protein channel. *J. Bacteriol.* 193, 4736–48.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., Higgins, P.G., (2015). *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 934–942.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., Dijkshoorn, L., (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic* species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Ac. Res. Microbiol.* 162, 393–404.

- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T.R., Livermore, D.M., (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 19, 588–595.
- Novovic, K., Mihajlovic, S., Vasiljevic, Z., Filipic, B., Begovic, J., Jovcic, B., (2015). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO Classification. *PLoS One* 10, e0122793.
- Ostadi Yalda, A.R.A., Moghadampour Mahdi, Faghri Jamshid, (2019). The Involvement of Drug Efflux System in Amikacin Resistance of Multiple Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in Isfahan, Iran. *J. Med. Bacteriol.* 8, 13–20.
- Pasteran, F., Mora, M.M., Albornoz, E., Faccone, D., Franco, R., Ortellado, J., Melgarejo, N., Gomez, S., Riquelme, I., Matheu, J., Ramon-Pardo, P., Corso, A., (2014). Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2575–8.
- Patel, G., Bonomo, R., (2013). “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front. Microbiol.*, 4, 48.
- Peleg, A.Y., de Breij, A., Adams, M.D., Cerqueira, G.M., Mocali, S., Galardini, M., Nibbering, P.H., Earl, A.M., Ward, D. V., Paterson, D.L., Seifert, H., Dijkshoorn, L., (2012). The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. *PLoS One* 7, e46984.
- Périchon, B., Goussard, S., Walewski, V., Krizova, L., Cerqueira, G., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D., Nemec, A., Courvalin, P., (2014). Identification of 50 class D β -lactamases and 65 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 936–49.
- Pinzon, J.O., Mantilla, J.R., Venezuela, E.M., Fernández, F., Álvarez, C.A., Osorio, E., (2011). Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio.*10-2.
- Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 24–38.
- Pour, N.K., Dusane, D.H., Dhakephalkar, P.K., Zamin, F.R., Zinjarde, S.S., Chopade, B.A., (2011). Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62, 328–38.
- Queenan, A.M., Bush, K., (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 440–58.
- Rafei, R., Dabboussi, F., Hamze, M., Eveillard, M., Lemarié, C., Gaultier, M.-P., Mallat, H., Moghnieh, R., Husni-Samaha, R., Joly-Guillou, M.-L., Kempf, M., (2014). Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. *PLoS One* 9, e115969.

- RHOVE, (2013). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (RHOVE). México, Distrito Federal.
- RHOVE, (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (RHOVE). México, Distrito Federal.
- Riley, M.A., Lizotte-Waniewski, M., (2009). Population genomics and the bacterial species concept. *Methods Mol. Biol.* 532, 367–77.
- Robledo, I.E., Aquino, E.E., Santé, M.I., Santana, J.L., Otero, D.M., León, C.F., Vázquez, G.J., (2010). Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1354–7.
- Rodríguez-noriega, E., León-garnica, G., Petersen-morfín, S., Pérez-gómez, H.R., González-díaz, E., Morfín-otero, R., (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México , 1973-2013. *Rev. Biomedica.* 34, 181–190.
- Rumbo, C., Gato, E., López, M., Ruiz de Alegría, C., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Pachón, J., Cisneros, J.M., Rodríguez-Baño, J., Pascual, A., Bou, G., Tomás, M., (2013). Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5247–57.
- Sabaté, M., Prats, G., (2002). Estructura y función de los integrones. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20, 341–345.
- Schleicher, X., Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Körber-Irrgang, B., Kresken, M., Seifert, H., (2013). Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005–2009). *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 737–742.
- Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S., Lindler, L., Mancuso, J., Milstrey, E., Bautista, C.T., Patel, J., Ewell, A., Hamilton, T., Gaddy, C., Tenney, M., Christopher, G., Petersen, K., Endy, T., Petruccielli, B., (2007). An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1577–84.
- Smolyakov, R., Borer, A., Riesenber, K., Schlaeffer, F., Alkan, M., Porath, A., Rimar, D., Almog, Y., Gilad, J., (2003). Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J. Hosp. Infect.* 54, 32–38.
- Sosa-Hernández, O., Matías-Téllez, B., Estrada-Hernández, A., Cureño-Díaz, M.A., Bello-López, J.M., (2019). Incidence and costs of ventilator-associated pneumonia in the adult intensive care unit of a tertiary referral hospital in Mexico. *Am. J. Infect. Control* 47, e21–e25.
- Stogios, P.J., Kuhn, M.L., Evdokimova, E., Law, M., Courvalin, P., Savchenko, A., (2017). Structural and Biochemical Characterization of *Acinetobacter* spp. Aminoglycoside Acetyltransferases Highlights Functional and Evolutionary Variation among Antibiotic Resistance Enzymes. *ACS Infect. Dis.* 3, 132–143.

- Sun, C., Hao, J., Dou, M., Gong, Y., (2015). Mutant prevention concentrations of levofloxacin, pazufloxacin and ciprofloxacin for *A. baumannii* and mutations in *gyrA* and *parC* genes. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 68, 313–317.
- Sung, J.Y., Koo, S.H., Kim, S., Kwon, K.C., (2014). Epidemiological Characterizations of Class 1 Integrons from Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Isolates in Daejeon, Korea. *Ann. Lab. Med.* 34, 293.
- Tamayo-Legorreta, E., Turrubiarres-Martínez, E., Garza-Ramos, U., Niño-Moreno, P., Barrios, H., Sánchez-Pérez, A., Reyna-Flores, F., Tovar-Oviedo, J., Magaña-Aquino, M., Cevallos, M.A., Silva-Sanchez, J., (2016). Outbreak Caused by *bla*_{OXA-72}-Producing *Acinetobacter baumannii* ST417 Detected in Clinical and Environmental Isolates. *Microb. Drug Resist.* 22, 129–133.
- Tian, G.-B., Adams-Haduch, J.M., Taracila, M., Bonomo, R.A., Wang, H.-N., Doi, Y., (2011). Extended-spectrum AmpC cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 confers resistance to cefepime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4922–5.
- Tognim, M.C.B., Andrade, S.S., Silbert, S., Gales, A.C., Jones, R.N., Sader, H.S., (2004). Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: Five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int. J. Infect. Dis.* 8, 284–291.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R., (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 296–316.
- Toleman, M.A., Walsh, T.R., (2010). ISCR elements are key players in IncA/C plasmid evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3534; author reply 3534.
- Touchon, M., Cury, J., Yoon, E.-J., Krizova, L., Cerqueira, G.C., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D., Lambert, T., Grillot-Courvalin, C., Nemeč, A., Courvalin, P., Rocha, E.P.C., (2014). The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol. Evol.* 6, 2866–82.
- Traglia, G.M., Almuzara, M., Vilacoba, E., Tuduri, A., Neumann, G., Pallone, E., Centrón, D., Ramírez, M.S., (2014). Bacteremia caused by an *Acinetobacter junii* strain harboring class 1 integron and diverse DNA mobile elements. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8, 666–9.
- Tripathi, P.C., Gajbhiye, S.R., Agrawal, G.N., (2014). Clinical and antimicrobial profile of *Acinetobacter* spp.: An emerging nosocomial superbug. *Adv. Biomed. Res.* 3, 13.
- Turton, J.F., Shah, J., Ozongwu, C., Pike, R., (2010). Incidence of *Acinetobacter* Species Other than *A. baumannii* among Clinical Isolates of *Acinetobacter*: Evidence for Emerging Species. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1445–1449.
- van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., van den Broek, P., Verhoef, J., Brisse, S., (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European

- hospitals. Res. Microbiol. 155, 105–12.
- Vargas-Cruz, B. M., (2019). Tesis de Licenciatura. Relación clonal y estudio de la resistencia a antibióticos en *Acinetobacter haemolyticus* causantes de infecciones. Facultad de Ciencias Químicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Vila, J., Martí, S., Sánchez-Céspedes, J., (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 59, 1210–5.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Jimenez de Anta, T., (1997). Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 39, 757–762.
- Villalón, P., Valdezate, S., Cabezas, T., Ortega, M., Garrido, N., Vindel, A., Medina-Pascual, M.J., Saez-Nieto, J.A., (2015). Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. BMC Microbiol. 15, 47.
- Visca, P., Seifert, H., Towner, K.J., (2011). *Acinetobacter* infection - an emerging threat to human health. IUBMB Life 63, 1048–1054.
- Wayne, P.C. and L.S.I., (2018). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Wibberg, D., Salto, I.P., Eikmeyer, F.G., Maus, I., Winkler, A., Nordmann, P., Pühler, A., Poirel, L., Schlüter, A., (2018). Complete Genome Sequencing of *Acinetobacter baumannii* Strain K50 Discloses the Large Conjugative Plasmid pK50a Encoding Carbapenemase OXA-23 and Extended-Spectrum β -Lactamase GES-11. Antimicrob. Agents Chemother. 62, AAC.00212-18.
- Wieczorek, P., Sacha, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Krawczyk, M., Tryniszewska, E., (2008). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia Histochem. Cytobiol. 46, 257–267.
- Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B., (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clin. Microbiol. Rev. 30, 409–447.
- Yoon, E.-J., Chabane, Y.N., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E., Grillot-Courvalin, C., (2015). Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. MBio 6, e00309-15-.
- Zahn, M., D'Agostino, T., Eren, E., Baslé, A., Ceccarelli, M., van den Berg, B., (2015). Small-Molecule Transport by CarO, an Abundant Eight-Stranded β -Barrel Outer Membrane Protein from *Acinetobacter baumannii*. J. Mol. Biol. 427, 2329–39.
- Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q., (2012). *Acinetobacter*: A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. Crit. Rev. Microbiol. 38, 30–51.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencia nucleotídica de los oligonucleotidos y condiciones de reacción de PCR empleados para la búsqueda de los diferentes genes de resistencia a antibióticos.

BETALACTAMASAS CLASE A						
Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>bla</i>_{BEL} (variantes)	852	BEL-1F	ATGAAACTGCTGCTCTACCCG	817	94°C/5 min 94°C/1 min 50°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos Bello-López, 2015
		BEL-1R	CAGAAGCAATTAATAACGCC			
<i>bla</i>_{PER-1}	927	PER-1F	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	925	94°C/5 min 94°C/1 min 42°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos Danel <i>et al.</i> , 1995
		PER-1R	ATGAATGTCATTATAAAAGC			
<i>bla</i>_{PER} (variantes)	927	PERd-F	GCCACTGTAGGYGTWGCMT	714	94°C/5 min 94°C/1 min 55°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos Bello-López, 2015
		PERd-R	GCGCRATRTRGCTTCATTGGT			
<i>bla</i>_{CTX-M}	910	KpCTX-F	TCTCCAGAATAAGGAATCCC	909	95°C/3 min 95°C/1 min 55 °C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos Bauernfeind <i>et al.</i> , 1996
		KpCTX-R	CCGTTTCCGCTATTACAAAC			
<i>bla</i>_{TEM}	861	TEM1F	AGAGTATGAGTATTCAACATT	837	95°C/3 min 95°C/1 min 45°C/1 min 72°C/5 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos Hansen <i>et al.</i> , 2004
		TEM2R	ATCTCAGCGATCTGTCTAT			
<i>bla</i>_{SHV}	871	SHV1F	GGGTTATTCTTATTGTCGCT	883	96°C/15 seg 96°C/15 seg 52°C/15 seg 72°C/2 min 72°C/3 min 10°C/∞	24 ciclos Mercier y Levesque, 1990
		SHV2R	TAGCGTTGCCAGTGCTCG			

Continua en la siguiente página

BETALACTAMASAS CLASE D

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
<i>bla_{OXA-23} like</i>	822	Oxa23like-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	94°C/5 min 94°C/30 seg 52°C/45 seg 72°C/45 seg 72°C/5 min 10°C/∞	30 ciclos Novovic et al., 2015
		Oxa23like-R	ATTTCTGACCGCATTCCAT			
<i>bla_{OXA-24} like</i>	828	Oxa24like-F	GGTTAGTTGGCCCCCTAAA	249	94°C/5 min 94°C/30 seg 52°C/45 seg 72°C/45 seg 72°C/5 min 10°C/∞	30 ciclos Novovic et al., 2015
		Oxa24like-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
<i>bla_{OXA-51} like</i>	825	Oxa51like-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	94°C/5 min 94°C/30 seg 52°C/45 seg 72°C/45 seg 72°C/5 min 10°C/∞	30 ciclos Novovic et al., 2015
		Oxa51like-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG			
<i>bla_{OXA-58} like</i>	843	Oxa58like-F	AAGTATTGGGGCTTGCTGCTG	599	94°C/5 min 94°C/30 seg 52°C/45 seg 72°C/45 seg 72°C/5 min 10°C/∞	30 ciclos Novovic et al., 2015
		Oxa58like-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC			
<i>bla_{OXA-214} like</i>	828	Oxa214-F	CACCCCTACTGTGTCATAG	798	95°C/5 min 95°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos Diseñados en este trabajo
		Oxa214-R	TTCAATTGCGTAAGTGCCTG			
<i>bla_{OXA-214} (Entorno)</i>	-	Ent-214-F	GGTCTATAGTGACAATAACTCCG	929	95°C/5 min 95°C/1 min 65°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos Vargas-Cruz, 2019
		Ent-214-R	CCCAACTCATGYTAAGAGATTGGGC			

Continua en la siguiente página

BETALACTAMASAS CLASE B

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia	
<i>bla_{VIM}</i> (variantes)	801	VIMd1-F	GATGGYGTTTGGTCGCATATC	Usando 1-2: 400 Usando 1-3: 600	94°C/5 min 94°C/1 min X °C/1 min	30 ciclos X1-2: 54°C X1-3: 50°C	Bello-López, 2015
		VIMd2-R	GAATGCGCAGCACCRGGA		72°C/1 min 72°C/10 min		
		VIMd3-R	CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA	10°C/∞			
<i>bla_{IMP}</i> (variantes)	741	IMPd-F	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	515	94°C/5 min 94°C/1 min 56°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos	Bello-López, 2015
		IMPd-R	GCCADGCTACDANATTTGCGTC				
<i>bla_{NDM-1}</i>	825	NDM-1F	CGGGCCGTATGAGTGATTGC	781	94°C/5 min 94°C/1 min 53°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos	Bello-López, 2015
		NDM-1R	CCAATATTATGCACCCGGTC				
<i>bla_{NDM}</i> (variantes)	813	NDMv-F	AATATTATGCACCCGGTCGCG	732	94°C/5 min 94°C/1 min 54°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos	Bello-López, 2015
		NDMv-R	CATCACGATCATGCTGGCCTT				

ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS

<i>aac(6')-I</i> (Familia)	438	aac6-lvar-F	ATGAATATTAACCTGCATCAG	438	94°C/5 min 94°C/30 seg 56°C/30 seg 72°C/1 min 72°C/7 min 10°C/∞	30 ciclos	Diseñados en este trabajo
		aac6-lvar-R	TTAATCTATTTTTACTAAAATAAACG				

SECUENCIA DE INSERCIÓN

<i>ISAb_{a1}</i>	-	ISAb _{a1} -F	GTGCTTTGCGCTCATCATGC	ISAb _{a1} -Ox _{a23} :1542pb	95°C/5 min 95°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min 72°C/10 min 10°C/∞	30 ciclos	Diseñados en este trabajo
--------------------------	---	-----------------------	----------------------	---	---	-----------	---------------------------

Anexo 2. Protocolo para preparar células competentes “express”

1. Placa fresca de cultivo de 24h
2. Tomar una colonia y sembrarla en 5mL de caldo LB. Dejarla toda la noche (\approx 14 horas) (6pm-8am) Dejarlo en la mesa (estático toda la noche a temperatura ambiente)
3. Al día siguiente ponerlo 1 hora en agitación hasta que tenga un D.O. 0.5
4. Centrifugar el cultivo 10000rpm 5min (frio)
5. Dividir en tubos eppendorf las células hasta tener una pastilla de una miniprep (un pequeño botón) (3 tubos)
6. Lavarlo con 1mL de agua inyectable estéril helada tres veces 10000 rpm 5 min (frio)
7. Después del último lavado se decanta y se resuspende en el volumen residual y así electroporar.
8. Las células se guardan con 200 μ L de glicerol al 10% en el ultracongelador a -70°C , cuando se quieran utilizar se descongelan en hielo, se resuspenden despacio y están listas para electroporar.

Anexo 3. Protocolo corto para extracción de plásmidos por lisis alcalina

1. Se parte de un cultivo saturado de 2 ml en LB de la cepa de interés.
2. Se transfiere 1.5 ml del cultivo a un tubo eppendorf. Se centrifuga a velocidad máxima por 20 segundos. Se descarta el sobrenadante.
3. La pastilla se resuspende en 200 microlitros de la solución I (GET) con ayuda del vortex (se agrega 3 microlitros de RNAsa a 0.4 µg/ µl)
4. Se agregan 200 microlitros de la solución II (NaOH 0.2 N /SDS 1 %). Se mezcla agitando con la mano. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Se agregan 200 microlitros de la solución III (Acetato 5 M). Se mezcla agitando con la mano. Se incuba en hielo durante 15 minutos. Se centrifuga a velocidad máxima por 10 minutos. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf, cuidando que el precipitado se elimine perfectamente. Esto último es el paso crucial si no se elimina completamente el precipitado hay que eliminarlo con una pipeta o volver a centrifugar otros 10 minutos. Algunas veces el precipitado se puede eliminar más fácilmente si se centrifuga 20 minutos.
6. Se adiciona al sobrenadante 1 ml de Etanol absoluto. Se mezcla agitando por inversión. Se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifuga a velocidad máxima por 10 minutos y se descarta el sobrenadante.
7. A la pastilla de ácidos nucleicos se le agregan 0.5 ml de Etanol al 70%. Se agita brevemente en el vortex. Se centrifuga a velocidad máxima por 5 minutos y se descarta el sobrenadante con la ayuda de una pipeta. (Se puede dar un spin adicional para hacer que todo el etanol este en el fondo y facilitar que se pueda remover más fácilmente con la pipeta).
8. La pastilla se seca a temperatura ambiente durante 4 minutos.
9. La pastilla se disuelve en 100 microlitros de agua.

SOLUCIONES:

Solución I GET: Glucosa 50 mM, 10mM EDTA pH 8, Trizma-base 25 mM (Conviene tener soluciones madre 0.5 M a pH 8 de Trizma-base y de EDTA)

Solución II: NaOH 0.2 N /SDS 1 %, en agua.

Solución III: Se prepara del siguiente modo: a 60 mililitros de una solución de acetato de potasio 5M se le agregan 40 mililitros de ácido acético glacial.

Anexo 4. Alineamiento de las variantes de la familia OXA-214-like y el nuevo alelo OXA-575 encontrado en la cepa *A. haemolyticus* AN3

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AN3-OXA.new          MKLSKLYI LTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSNQIENDQTKQIASLFENVQTTGVLITFDG
OXA_AN54_prot.fa    MKLSKLYTLTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSNQIENDQTKQIASLFENVQTTGVLITFDG
OXA-265             MKLSKLYTLTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSNQIENDQTKQIASLFENVQTTGVLITFDG
OXA-215             MKLSKLYTLTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSNQIENDQTKQIASLFENVQTTGVLITFDG
OXA-264             MKLSKLYTLTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSNQIENDQTKQIASLFENVQTTGVLITFDG
OXA-214             MKLSKLYTLTVLIGFGLSGVACQHIHTPVSNQIENDQTKQIASLFENVQTTGVLITFDG
*****

```

```

AN3-OXA.new          QAYKAYGNLNRAR TAYIPASTFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKDLT
OXA_AN54_prot.fa    QAYKAYGNLNRAKAAYIPASTFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKDLT
OXA-265             QAYKAYGNLNRAKAAYIPASTFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKDLT
OXA-215             QAYKAYGNLNRAKTAYIPASTFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKDLT
OXA-264             QAYKAYGNLNRAKTAYIPASTFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKDLT
OXA-214             QAYKAYGNLNRAKTAYIPASTFKILNALIGIEHDKTSPNEVFKWDGQKRAFESWEKDLT
*****:*****

```

```

AN3-OXA.new          LAEAMQASAVPVYQALAQRIGLDLMAKEVKRVGFGNTRIGTQVDNFWLIGPLKITPIEEA
OXA_AN54_prot.fa    LAEAMQASAVPVYQALAQRIGLDLMAKEVKRVGFGNTRIGTQVDNFWLIGPLKITPIEEA
OXA-265             LAEAMQASAVPVYQALAQRIGLDLMAKEVKRVGFGNTRIGTQVDNFWLIGPLKITPIEEA
OXA-215             LAEAMQASAVPVYQALAQRIGLDLMAKEVKRVGFGNTRIGTQVDNFWLIGPLKITPIEEA
OXA-264             LAEAMQASAVPVYQALAQRIGLDLMAKEVKRVGFGNTRIGTQVDNFWLIGPLKITPIEEA
OXA-214             LAEAMQASAVPVYQALAQRIGLDLMAKEVKRVGFGNTRIGTQVDNFWLIGPLKITPIEEA
*****

```

```

AN3-OXA.new          QFAYRLAKREL PFTQDTQKQVIDMLLVDEIRGTKVYAKSGWGM DITPQVGWWTGWIEDPN
OXA_AN54_prot.fa    QFAYRLAKQELPFTPKTQQQVIDMLLVDEIRGTKVYAKSGWGM DITPQVGWWTGWIEDPN
OXA-265             QFAYRLAKQELPFTPKTQQQVIDMLLVDEIRGTKVYAKSGWGM DITPQVGWWTGWIEDPN
OXA-215             QFAYRLAKQELPFTPKTQQQVIDMLLVDEIRGTKVYAKSGWGM DITPQVGWWTGWIEDPN
OXA-264             QFAYRLAKQELPFTPKTQQQVIDMLLVDEIRGTKVYAKSGWGM DITPQVGWWTGWIEDPN
OXA-214             QFAYRLAKQELPFTPKTQQQVIDMLLVDEIRGTKVYAKSGWGM DITPQVGWWTGWIEDPN
*****:*****

```

```

AN3-OXA.new          GKVIAFSLNMEMNQPAHAAARKEIVYQALTQLKLL
OXA_AN54_prot.fa    GKVIAFSLNMEMNQPAHAAARKEIVYQALTQLKLL
OXA-265             GKVIAFSLNMEMNQPAHAAARKEIVYQALTQLKLL
OXA-215             GKVIAFSLNMEMNQPTHAAARKEIVYQALTQLKLL
OXA-264             GKVIAFSLNMEMNQPAHAAARKEIVYQALTQLKLL
OXA-214             GKVIAFSLNMEMNQPAHAAARKEIVYQALTQLKLL
*****:*****

```

- La nueva variante OXA-575 tiene 6 cambios con respecto a OXA-214: T8I, K74R, Q189R, P195Q, K196D, Q199K
- En gris se resaltan los aminoácidos del sitio activo

Anexo 5. Alineamiento de las variantes de la betalactamasa TEM y el nuevo alelo TEM-229 en las cepas *A. haemolyticus*

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```

TEM-229_new      MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP      60
TEM-116          MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP      60
TEM-1            MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP      60
TEM-171          MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP      60
*****

TEM-229_new      EERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL      120
TEM-116          EERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL      120
TEM-1            EERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL      120
TEM-171          EERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL      120
*****

TEM-229_new      CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHSVTRLDLDRWEPELNEAIPNDERDTTM      180
TEM-116          CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHSVTRLDLDRWEPELNEAIPNDERDTTM      180
TEM-1            CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHSVTRLDLDRWEPELNEAIPNDERDTTM      180
TEM-171          CSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHSVTRLDLDRWEPELNEAIPNDERDTTM      180
*****

TEM-229_new      PVAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGS      240
TEM-116          PVAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGS      240
TEM-1            PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGS      240
TEM-171          PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSALPAGWFIADKSGAGERGS      240
* .*****

TEM-229_new      RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW      286
TEM-116          RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW      286
TEM-1            RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW      286
TEM-171          RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW      286
*****

```

- La nueva variante TEM-229 tiene un cambio con respecto a TEM-116: I256V

Anexo 6. Alineamiento de la subunidad GyrA de las cepas estudiadas

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```
AN71      MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSVIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMHELGNNDYNKA
ACICU     MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSVIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMHELGNNDYNKA
AN4       MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSVIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLFAMHELGNNDYNKA
AN54      MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSVIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLFAMHELGNNDYNKA
AN7       MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSVIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLFAMHELGNNDYNKA
AN3       MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSVIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLFAMHELGNNDYNKA
*****
AN71      YKKSARVVGDVIGKYHPHGLAVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRY
ACICU     YKKSARVVGDVIGKYHPHGLAVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQGNFGSIDGDSAAAMRY
AN4       YKKSARVVGDVIGKYHPHGLAVYETIVRMAQDFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDSAAAMRY
AN54      YKKSARVVGDVIGKYHPHGD SAVYETIVRMAQDFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDSAAAMRY
AN7       YKKSARVVGDVIGKYHPHGD SAVYETIVRMAQDFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDSAAAMRY
AN3       YKKSARVVGDVIGKYHPHGD SAVYETIVRMAQDFSLRYMLVDGQGNFGSVDGDSAAAMRY
*****
AN71      TEVRMTKLAHELLADLEKDTVDWEDNYDGSERIPVLPTRVNP LLINGAAGI AVGMATNM
ACICU     TEVRMTKLAHELLADLEKDTVDWEDNYDGSERIPVLPTRVNP LLINGAAGI AVGMATNM
AN4       TEVRMQKLTHEILADLEKDTVDWEDNYDGSERIPQVMPTRIPNLLINGTTGIAVGMATNM
AN54      TEVRMQKLTHEILADLEKDTVDWEDNYDGSERIPQVMPTRIPNLLINGTTGIAVGMATNM
AN7       TEVRMQKLTHEILADLEKDTVDWEDNYDGSERIPQVMPTRIPNLLINGTTGIAVGMATNM
AN3       TEVRMQKLTHEILADLEKDTVDWEDNYDGSERIPQVMPTRIPNLLINGTTGIAVGMATNM
*****
AN71      APHNMTEVVNACLAYADNPNISIEGLMEYITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI
ACICU     APHNMTEVVNACLAYADNPNISIEGLMEYITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI
AN4       APHNMTEVVNACLAYANNPNISIEGLMEHITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI
AN54      APHNMTEVVNACLAYANNPNISVEGLMEHITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI
AN7       APHNMTEVVNACLAYANNPNISVEGLMEHITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI
AN3       APHNMTEVVNACLAYANNPNISVEGLMEHITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI
*****
AN71      RGKYHFEEDEKTRGTTIVFTEIPYQVNKARVIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR
ACICU     RGKYHFEEDEKTRGTTIVFTEIPYQVNKARVIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR
AN4       RGKYHFEEDEKTRGTTIVFTEIPYQVNKAKTIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR
AN54      RGKYHFEEDEKTRGTTIVFTEIPYQVNKAKTIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR
AN7       RGKYHFEEDEKTRGTTIVFTEIPYQVNKAKTIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR
AN3       RGKYHFEEDEKTRGTTIVFTEIPYQVNKAKTIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR
*****
AN71      IAIDLKRGENA EVVNNLFLHTQLQNSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV
ACICU     IAIDLKRGENA EVVNNLFLHTQLQNSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV
AN4       IAIDLKRGENA EVVNNLFLHTQLQNSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV
AN54      IAIDLKRGENA EVVNNLFLHTQLQNSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV
AN7       IAIDLKRGENA EVVNNLFLHTQLQNSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV
AN3       IAIDLKRGENA EVVNNLFLHTQLQNSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV
*****
AN71      TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLLAGEWAGGGVVA
ACICU     TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLLAGEWAGGGVVA
AN4       TRRTMYELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPSEARERLQAGEWAGGGVVA
AN54      TRRTMYELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLQAGEWAGGGVVA
AN7       TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLQAGEWAGGGVVA
AN3       TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLQAGEWAGGGVVA
```

Anexo 7. Alineamiento de la subunidad ParC de las cepas estudiadas

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```
AN71      MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS
ACICU     MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS
AN3       MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS
AN7       MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS
AN54     MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS
AN4       MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS
*****

AN71      SGKPKKSARTVGDVLDGKYHPHGDLCACYEAMVMAQPFYSYRYPLIEGQGNWGSPPDPKSFA
ACICU     SGKPKKSARTVGDVLDGKYHPHGDLCACYEAMVMAQPFYSYRYPLIEGQGNWGSPPDPKSFA
AN3       TGKPKKSARTVGDVLDGKYHPHGDLCACYEAMVMAQPFYSYRYPLIEGQGNWGSPPDPKSFA
AN7       TGKPKKSARTVGDVLDGKYHPHGDLCACYEAMVMAQPFYSYRYPLIEGQGNWGSPPDPKSFA
AN54     TGKPKKSARTVGDVLDGKYHPHGDLCACYEAMVMAQPFYSYRYPLIEGQGNWGSPPDPKSFA
AN4       TGKPKKSARTVGDVLDGKYHPHGDLCACYEAMVMAQPFYSYRYPLIEGQGNWGSPPDPKSFA
:*****

AN71      AMRYTEAKLSAYSELLSELGQGTSEWQDNFDGSLKEPITLPAVNPINLLNGTTGIAVGM
ACICU     AMRYTEAKLSAYSELLSELGQGTSEWQDNFDGSLKEPITLPAVNPINLLNGTTGIAVGM
AN3       AMRYTEAKLSAYSELLSELGQGTSEWQDNFDGSMKEPITLPAVNPINLLNGTTGIAVGM
AN7       AMRYTEAKLSAYSELLSELGQGTSEWQDNFDGSMKEPITLPAVNPINLLNGTTGIAVGM
AN54     AMRYTEAKLSAYSELLSELGQGTSEWQDNFDGSMKEPITLPAVNPINLLNGTTGIAVGM
AN4       AMRYTEAKLSAYSELLSELGQGTSEWQDNFDGSMKEPITLPAVNPINLLNGTTGIAVGM
*****

AN71      ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPQTSDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLKIQTTR
ACICU     ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPQTSDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLKIQTTR
AN3       ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPETTDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLKIQTTR
AN7       ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPETTDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLKIQTTR
AN54     ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPETTDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLKIQTTR
AN4       ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPETTDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLKIQTTR
*****

AN71      GSYRMRAVYTIKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQMIAKKLPLVVDVIRDES DHENPTR
ACICU     GSYRMRAVYTIKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQMIAKKLPLVVDVIRDES DHENPTR
AN3       GSYRMRSIYTVKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQMIAKKLPLVADIRDES DHKNPTR
AN7       GSYRMRSIYTVKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQMIAKKLPLVADIRDES DHKNPTR
AN54     GSYRMRSIYTVKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQMIAKKLPLVADIRDES DHKNPTR
AN4       GSYRMRSIYTVKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQMIAKKLPLVADIRDES DHKNPTR
*****

AN71      LVIVLRSNRIDAEAVMSHLFATTDLESSYRVNLMIGEDGRPQVKSIRRILLEWIEIRKK
ACICU     LVIVLRSNRIDAEAVMSHLFATTDLESSYRVNLMIGEDGRPQVKSIRRILLEWIEIRKK
AN3       LVIVLRSNRVDAETVMSHLFATTDLESSYRVNLMIGADGRPQVKSIRRILLEWIEIRKQ
AN7       LVIVLRSNRVDAETVMSHLFATTDLESSYRVNLMIGADGRPQVKSIRRILLEWIEIRKQ
AN54     LVIVLRSNRVDAETVMSHLFATTDLESSYRVNLMIGADGRPQVKSIRRILLEWIEIRKQ
AN4       LVIVLRSNRVDAETVMSHLFATTDLESSYRVNLMIGADGRPQVKSIRRILLEWIEIRKQ
*****

AN71      TVTRRLQYHLNRIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA
ACICU     TVTRRLQYHLNRIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA
AN3       TVTRRLQYHLTKIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA
AN7       TVTRRLQYHLTKIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA
AN54     TVTRRLQYHLTKIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA
AN4       TVTRRLQYHLTKIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA
```

Anexo 8. Estadísticas de calidad de los ensamblados de la cepa *A. haemolyticus* AN54

Ensamblados realizados:

Ensamblador	N50	Longitud	#Contigs/Unitigs
Velveth v1.2.10 (PLACNET)	2,048	16,995	33723
SMRT/PacBio	30,544	257,198	14
✓ Spades v3.11.1 (Híbrido)	357,785	71,629	51
✓ Unicycler v0.4.1 (Híbrido)	1,797,259	1,809,779	9
Metassembler v1.5	357,785	148,800	24

Calidad del ensamblado final:

Cepa	Tecnología de secuenciación	Cobertura del genoma	N50	No. de contigs >30	No. total de contigs	Ave. Longitud contig	Log. total del ensamblado
AN54	Illumina MiSeq; PacBio RSII	140	3600228	6	6	613512	3681073

Anexo 10. Estadísticas de calidad del ensamble de la cepa *A. baumannii* AN71

Ensamble con SPades		Ensamble con SPAdes --plasmid	
Assembly		Assembly	
# contigs (>= 0 bp)	216	# contigs (>= 0 bp)	17
# contigs (>= 1000 bp)	101	# contigs (>= 1000 bp)	6
# contigs (>= 5000 bp)	60	# contigs (>= 5000 bp)	4
# contigs (>= 10000 bp)	48	# contigs (>= 10000 bp)	1
# contigs (>= 25000 bp)	42	# contigs (>= 25000 bp)	0
# contigs (>= 50000 bp)	26	# contigs (>= 50000 bp)	0
Total length (>= 0 bp)	3934788	Total length (>= 0 bp)	43878
Total length (>= 1000 bp)	3891210	Total length (>= 1000 bp)	39061
Total length (>= 5000 bp)	3796272	Total length (>= 5000 bp)	35209
Total length (>= 10000 bp)	3707401	Total length (>= 10000 bp)	11326
Total length (>= 25000 bp)	3595877	Total length (>= 25000 bp)	0
Total length (>= 50000 bp)	2996617	Total length (>= 50000 bp)	0
# contigs	132	# contigs	11
Largest contig	285171	Largest contig	11326
Total length	3913230	Total length	42004
GC (%)	39.00	GC (%)	36.84
N50	108028	N50	9990
N75	54141	N75	5320
L50	12	L50	2
L75	25	L75	4
# N's per 100 kbp	0.00	# N's per 100 kbp	0.00

Anexo 11. Alineamiento de los alelos de la porina CarO y la porina de la cepa *A. baumannii* AN71

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```

CarO2      MKVLRVLVTTTALLAAGAAMADEAVVHDSYAFDKNQLIPVGARAEVGTGTYGGALLWQAN
CarO1      MKVLRVLVTTTALLAAGAAMADEAVVHDSYAFDKNQLIPVGARAEVGTGTYGGALLWQAN
AN71      MKVLRVLVTTTALLAAGAAMADEAVVHDSYAFDKNQLIPVGARAEVGTGTYGGALLWQAN
CarO3      MKVLRVLVTTTALLAAGAAMADEAVVHDSYAFDKNQLIPVGARAEVGTGTYGGALLWQAN
ATCC17978  MKVLRVLVTTTALLAAGAAMADEAVVHDSYAFDKNQLIPVGARAEVGTGTYGGALLWQAN
*****

CarO2      PYVGLALGYNGGDISWSDDLSTINGTKYDMDMDNKLAYLNAEIRPWGASTNPWAQGLYVAA
CarO1      PYVGLALGYNGGDISWTDDVSVNGTKYDLDMDNNNVYLNAEIRPWGASTNPWAQGLYIAA
AN71      PYVGLALGYNGGDISWSDDVKVNGSTYDLDMDNNNVYLNAEIRPWGASTNPWAQGLYVAA
CarO3      PYVGLALGYNGGDISWSDDVKVNGSTYDLDMDNNNVYLNAEIRPWGASTNPWAQGLYVAA
ATCC17978  PYVGLALGYNGGDISWRDDLSTINGTKYDMDMDNKNVYLNAEIRPWGASTNPWAQGLYVAA
*****

CarO2      GAAYVDNQYDLTKNVGTNASVEIDGNRFNGGA--NGVSIAGNLKYDNDIAPYIGFGFAPK
CarO1      GAAYLDNDYDLAKRIGNGDTLSIDGKNYQQAVPGQEGGVRGKMSYKNDIAPYLGFGFAPK
AN71      GAAYLDNDYDLTRNVDATRSFRVNNQDFIAGA--DGVKINGQMSYKNDIAPYLGFGFAPK
CarO3      GAAYLDNDYDLTRNVDATRSFRVNNQDFIAGA--DGVKINGQMSYKNDIAPYLGFGFAPK
ATCC17978  GAAYLDNDYDLTKRSSDG-TIKINGTNYS-----YNGSVNGQLSYKNDIAPYLGFGFAPK
*****

CarO2      FSKNWGVFGEVGAYYSGNPKVSLASNNDALIGSDGRTLKGLTDDQERKIANDDKYKWLFPV
CarO1      ISKNWGVFGEVGAYYTGPNPKVELTQYNLAPVTGNPTSAQDAVDKEANEIRNDNKYEWMFPV
AN71      INKNWGVFGEVGAYYTGPNPTVCLVSSGSAVTTG-DQSLEEAVNAEARKIANDDKYKWLFPV
CarO3      INKNWGVFGEVGAYYTGPNPTVCLVSSGSAVTTG-DQSLEEAVNAEARKIANDDKYKWLFPV
ATCC17978  INKNWGVFGEVGAYYTGPNPTVELDKQGTFFVNAA-GGNADADLRAEENKIRNDDKYKWFVPV
:*****

CarO2      GKVGVNIFYW
CarO1      GKVGVNIFYW
AN71      GKVGVNFFW
CarO3      GKVGVNFFW
ATCC17978  GKVGVNIFYW
*****

```

Anexo 12. Actividades realizadas durante la estancia doctoral

ACTIVIDADES DERIVADAS DE ESTE PROYECTO

Publicaciones en revistas indexadas

1. **Bello-López E**, Castro-Jaimes S, Cevallos MÁ, Rocha-Gracia RDC, Castañeda-Lucio M, Sáenz Y, Torres C, Gutiérrez-Cazares Z, Martínez-Laguna Y, Lozano-Zarain P. 2019. Resistome and a Novel *bla*_{NDM-1}-Harboring Plasmid of an *Acinetobacter haemolyticus* Strain from a Children's Hospital in Puebla, Mexico. *Microb Drug Resist.* Jul 23. doi: 10.1089/mdr.2019.0034. **Factor de impacto: 2.397. ISSN: 1076-6294. Online ISSN: 1931-8448. New York.**

Estancias

1. Estancia de Investigación Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Cuernavaca, Morelos. Bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Cevallos. (28 de marzo de 2017 al 28 de abril de 2017).
2. Estancia de Investigación Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Cuernavaca, Morelos. Bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Cevallos. (2 de febrero de 2018 al 7 de marzo de 2018).

Ponencias en Hospitales

1. Relevancia clínica de bacterias del grupo ESCAPE, Hospital Regional ISSSTE Puebla, Nacional, 18 de noviembre, 2016.
2. Actualidades en la identificación y mecanismos de resistencia de *Acinetobacter*, Hospital Regional ISSSTE Puebla, Nacional, 4 de marzo de 2016.
3. Impacto de la resistencia a antibióticos en bacilos gramnegativos no fermentadores. Curso: Situación actual de resistencias bacterianas y uso correcto de antibióticos en niños. Hospital Regional ISSSTE Puebla, Nacional, Conferencia, 22 de noviembre de 2018.
4. Secretaria de Salud, Gobierno de Puebla. Dirección de Salud Pública y Vigilancia Epidemiológica. Subdirección de Vigilancia Epidemiológica. Curso-Taller: "Infecciones Hospitalarias" Tema: Mecanismos Moleculares de resistencia en cepas de *Acinetobacter baumannii* en IAAS. Conferencia, 28-30 de octubre de 2019

Clases impartidas

1. Mecanismos generales de acción y resistencia a los antimicrobianos. En apoyo a la materia de Microbiología General. Licenciatura en Biotecnología. 16 de marzo de 2017.
2. Antibióticos, Sensibilidad y resistencia microbiana. En apoyo a la materia de Microbiología General. Licenciatura en Biotecnología. 25 de octubre de 2017.
3. Diseño de oligonucleótidos y análisis de secuencias. En apoyo al curso de Bioquímica de Macromoléculas. Licenciatura en Biomedicina. 6 de noviembre de 2017.
4. Diseño de oligonucleótidos y análisis de secuencias. En apoyo al curso de Bioquímica de Macromoléculas. Licenciatura en Biomedicina. 30 de agosto de 2018.
5. Antibióticos y crecimiento microbiano. En apoyo a la materia de Microbiología General. Licenciatura en Biotecnología. 1 de marzo de 2019.
6. Mecanismos de acción y resistencia a los antimicrobianos. En apoyo a la materia de Microbiología General. Licenciatura en Biotecnología. 22 de marzo de 2019.
7. Infecciones nosocomiales. Enterobacterias, métodos de diagnóstico en el laboratorio, manifestaciones clínicas, patología, epidemiología, tratamiento y prevención. En apoyo a la materia de Microbiología Médica. Posgrado en Microbiología (Maestría). 19 de septiembre de 2019.

Cursos

1. Ciclo de conferencias de Vacunología. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 13-14 de octubre de 2016. 8 horas.
2. Conoce el correcto manejo del RPBI conforme a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP/Servicios Profesionales Ecológicos S.A. de C.V. septiembre de 2016.
3. Wellcome Genome Campus Advanced Courses. Genomics and Epidemiological Surveillance of Bacterial Pathogens. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 9-14 July 2017. 40 hours. **Se obtuvo beca completa por concurso. De este curso surgió el proyecto en colaboración financiado por el Instituto Sanger “Genomic epidemiology of CTX-M producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin America and the Caribbean”**
4. Manejo y Análisis de Datos de Secuenciación Masiva. Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Morelos, 11-13 de enero de 2017. 24 horas.
5. Curso Teórico-Práctico: Ensamble, anotación y creación de grupos de homólogos de genomas bacterianos. Centro de Ciencias Genómicas e Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 9-12 de octubre de 2017.

6. Interpretación del Antibiograma en la práctica clínica diaria. EviMed, EUCAST, Universidad de la República de Uruguay. Abril-Junio de 2018. 30 horas.
7. Bacterial genomes: disease outbreaks and antimicrobial resistance. Wellcome Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences.

Congresos

1. **Bello-López M.E.**, Rocha-Gracia R.C. Torres C. Sáenz Y.; Gutiérrez-Cázarez Z.; ¹Castañeda-Lucio M.; Martínez-Laguna Y. Lozano-Zarain P. **Estudio genético de la resistencia en aislados de *Acinetobacter* spp. provenientes de un hospital infantil de la ciudad de Puebla.** IB-08. XXXV Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica, Boca del Rio, Veracruz, del **09 al 12 de noviembre de 2016. Se obtuvo reconocimiento y beca por obtener 2° lugar en la categoría de Investigación Básica.**
2. **María Elena Bello López**, Yolanda Saenz, Hussein Chalhoub, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Zita Gutiérrez Cázarez, Miguel Castañeda Lucio, Ygnacio Martínez Laguna, Patricia Lozano Zarain. **Estudio genético de la resistencia y correlación entre métodos de susceptibilidad a antibióticos en aislados de *Acinetobacter* spp. provenientes de un hospital infantil.** Segundo Congreso Nacional de investigaciones Microbiológicas. **7 al 9 de noviembre 2016. Puebla, Puebla Mex.**
3. **Bello-López M.E.**, Rocha-Gracia R.C., Cevallos M.A., Sáenz Y., Torres C.; Gutiérrez-Cázarez Z.; Castañeda-Lucio M.; Martínez-Laguna Y. Lozano-Zarain P. **Tipificación de aislados de *Acinetobacter* y caracterización de un plásmido con NDM-1 en una cepa de *A. haemolyticus* mediante secuenciación masiva.** XXXVI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica SLIPE. **8 al 11 de noviembre 2017. Cancún Quintana Roo, México.**
4. **Bello-López María Elena**, Rocha-Gracia Rosa Del Carmen, Cevallos Miguel Ángel, Vargas-Cruz Michelle, Sáenz Yolanda, Torres Carmen, Gutiérrez-Cázarez Zita, Castañeda-Lucio Miguel, Martínez-Laguna Ygnacio, Lozano-Zarain Patricia: **Tipificación de cepas clínicas de *Acinetobacter* spp y estudio de genes de resistencia a antibióticos.** **XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. 13 - 16 de noviembre 2018. Centro de Eventos y Convenciones Centroparque, Santiago, Chile.**
5. **Bello-López María Elena**, Castro-Jaimes Semiramis, Cevallos Miguel Ángel, Rocha-Gracia Rosa Del Carmen, Sáenz Yolanda, Torres Carmen, Gutiérrez-Cázarez Zita, Castañeda-Lucio Miguel, Martínez-Laguna Ygnacio, Lozano-Zarain Patricia. **Caracterización de un plásmido portador de *bla*NDM-1 en una cepa clínica de *Acinetobacter haemolyticus* aislada en un hospital pediátrico de Puebla, México.** XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. **Centro de Eventos y Convenciones Centroparque, Santiago, Chile. 13 - 16 de noviembre 2018.**

6. Verdugo-Yocupicio Ricardo, **Bello-López María Elena**, Rocha-Gracia Rosa del Carmen, Jimenez-Flores Guadalupe, Lozano-Zarain Patricia. **Estudio de la resistencia en *Acinetobacter spp.* causantes de infecciones en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla.** XLIV Congreso Anual de la AMIMC. **Poliforum de León, Gto. 22 al 25 de mayo 2019.**
7. Brigida Michelle Vargas Cruz, **María Elena Bello López**, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Semiramis Castro-Jaimes, Miguel Ángel Cevallos, Yolanda Sáenz, Carmen Torres, Zita Gutiérrez Cázarez, Miguel Castañeda Lucio, Ygnacio Martínez Laguna, Patricia Lozano Zarain. **Relación clonal y estudio de la resistencia a antimicrobianos en *Acinetobacter spp.* causantes de infección en un hospital pediátrico.** XXIII Congreso Internacional de la Asociación Mexicana para el Estudio de las Infecciones Nosocomiales. **Auditorio Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social México. 18,19 y 20 de febrero 2019**
8. Verdugo-Yocupicio Ricardo, **Bello-López María Elena**, Rocha-Gracia Rosa del Carmen, Jimenez-Flores Guadalupe, Lozano-Zarain Patricia. **Mecanismos de resistencia en *Acinetobacter spp.* causantes de infecciones en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla.** II Congreso Internacional de Microbiología Básica y aplicada. Unidad de Seminarios BUAP, **Puebla Puebla. 11 – 13 de septiembre 2019.**
9. Ricardo Verdugo-Yocupicio, **María Elena Bello-López**, Rosa del Carmen Rocha-Gracia, Guadalupe Jiménez-Flores, Deysi Alejandrina Cabrera-Segura, Patricia Lozano-Zarain. Study of antibiotic resistance mechanisms in *Acinetobacter spp.* isolated from hospitalized patients. **VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología. Oaxaca Oaxaca. 27-31 de octubre 2019.**

ACTIVIDADES EN COLABORACIÓN

Publicaciones en revistas indexadas

1. Alma López-García, Rosa del Carmen Rocha-Gracia, **Elena Bello-López**, Claudia Juárez-Zelocualtecal, Yolanda Sáenz, Miguel Castañeda-Lucio, Liliana López-Pliego, María Cristina González-Vázquez, Carmen Torres, Teolincacihuatl Ayala-Nuñez, Guadalupe Jiménez-Flores, Margarita María de la Paz Arenas-Hernández, Patricia Lozano-Zarain. 2018. Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican Hospital. *Infection and Drug Resistance*. 11: 1523-1536. doi: 10.2147/IDR.S173455.ISSN: **1178-6973. Factor de impacto: 3.443. New Zealand.**

Congresos

1. P Lozano-Zarain, A López-García, J Gómez-Martínez, RC Rocha-Gracia, **E Bello-López**, M Castañeda-Lucio, C Torres, Y Saéñz-Domínguez, MMP Arenas-Hernández, G Jiménez-Flores. Resistencia molecular y caracterización de plásmidos en *Pseudomonas aeruginosa* Multidrogoresistentes de un hospital mexicano. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología **ALAM-CAM 2016**, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME. **26 30 septiembre 2016**. Poster: MA-0072 **Bacteriología** clínica. Rosario Argentina
2. Ayala-Nuñez T, **Bello-Lopez E.**, Rocha-Gracia RC, Castañeda-Lucio M, Nepomuceno-Rendón A, Juárez-Zelocualtecal C, Huerta-Romano F, Martínez-Laguna Y, Lozano-Zarain P. Caracterización genotípica de la resistencia en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología **ALAM-CAM 2016**, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME. **26 30 septiembre 2016** Poster: MA-0083 **Bacteriología** clínica.
3. López GA, **Bello LME**, Gómez MJ, Pastor GE, Rocha GRC, Sáenz Y, Arenas HMMP, Jiménez FG y Lozano ZP. Análisis molecular de mecanismos de resistencia antimicrobiana en *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistentes (MDR) en un hospital de Puebla. IB02. XXXV Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica, Boca del Rio, Veracruz, del **09 al 12 de noviembre de 2016**.
4. Angélica Morales-Luna; **Elena Bello-López**; Rosa del C. Rocha-Gracia; Zita Gutiérrez-Cázares; Ygnacio Martínez-Laguna; Patricia Lozano-Zarain. Detección de *bla_{L1}* Y *bla_{L2}* en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*. Segundo Congreso Nacional de investigaciones Microbiológicas. **7 al 9 de noviembre 2016**. Puebla, Puebla Mex.
5. Teolincacihuatl Ayala-Nuñez, **Elena Bello-Lopez**, Rosa C. Rocha-Gracia, Fernando Huerta-Romano, Ygnacio Martínez-Laguna, Patricia Lozano-Zarain. Presencia de cassettes génicos “*gcuD*” en integrones clase I en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente-resistente a carbapenémicos (MDR-RC). Segundo Congreso Nacional de investigaciones Microbiológicas. **7 al 9 de noviembre 2016**. Puebla, Puebla Mex.
6. López García Alma; **Bello López María Elena**; Rocha Gracia Rosa del C; Arenas Hernández Margarita M. P.; Sáenz Y.; Jiménez Flores Guadalupe y Lozano Zarain Patricia. Nuevos alelos de β -lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de un hospital de Puebla. Segundo Congreso Nacional de investigaciones Microbiológicas. **7 al 9 de noviembre 2016**. Puebla, Puebla Mex.
7. López GA, Rocha GRC1, **Bello LME**, Juárez ZCA , Sáenz Y , Castañeda LM , Torres C , Jiménez FG , Martínez LY , Arenas HMMP, Lozano Zarain P. Mecanismos responsables de la aparición de resistencia a carbapenémicos en cepas provenientes de un hospital de Puebla. XXXVI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica SLIPE. **8 al 11 de noviembre 2017**. Cancún Quintana Roo, México

8. Morales LA, Rocha GRC, **Bello LME**, Gutiérrez CZ, Castañeda LM, Lozano ZP. Martínez LY. Resistencia a antibióticos en *Stenotrophomonas maltophilia* causantes de infecciones en un hospital pediátrico en Puebla. XXXVI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica SLIPE. **8 al 11 de noviembre 2017. Cancún Quintana Roo, México.**
9. María Cristina González Vázquez, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Alejandro Carabarin Lima, **Bello López María Elena**, Ygnacio Martínez Laguna, Patricia Lozano Zarain. Participación de la porina OprD en la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*. XXXVI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica SLIPE. **8 al 11 de noviembre 2017. Cancún Quintana Roo, México.**
10. Angélica Morales-Luna; **Elena Bello-López**; Rosa del C. Rocha-Gracia; Zita Gutiérrez-Cázares; Ygnacio Martínez-Laguna; Patricia Lozano-Zarain. Estudio de la resistencia a antibióticos en *Stenotrophomonas maltophilia*. I Congreso Internacional de Microbiología Básica y Aplicada. **6 – 8 septiembre 2017. Puebla, Puebla, México.**
11. López-García Alma, **Bello-López María Elena**, Rocha-Gracia Rosa del Carmen, Cevallos Miguel Ángel, Arenas-Hernández Margarita María de la Paz, Sáenz Yolanda, Jiménez-Flores Guadalupe, y Lozano-Zarain Patricia. Resistencia de dos aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo-resistentes y resistentes a carbapenémicos. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología. **13 - 16 de noviembre 2018. Centro de Eventos y Convenciones Centroparque, Santiago, Chile.**
12. Pérez Sánchez Marco Arturo; Rocha-Gracia R. del C.; **Bello López E.**; Peráno Flores D.; Jiménez Flores G.; Treviño Mora S.; Gutiérrez Cazares Z.; González Bonilla C. R.; González Ibarra J.; Grajales Muñiz C.; Rojas Mendoza T.; Alvarado Yaah J. E.; Santacruz Tinoco C. E.; Lozano Zarain P. Determinación fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella spp.* aisladas de diferentes hospitales mexicanos. II Congreso Internacional de Microbiología Básica y aplicada. Unidad de Seminarios BUAP, **Puebla Puebla. 11 – 13 de septiembre 2019.**

Resistome and a Novel *bla*_{NDM-1}-Harboring Plasmid of an *Acinetobacter haemolyticus* Strain from a Children's Hospital in Puebla, Mexico

Elena Bello-López,¹ Semiramis Castro-Jaimes,² Miguel Ángel Cevallos,² Rosa del Carmen Rocha-Gracia,¹ Miguel Castañeda-Lucio,¹ Yolanda Sáenz,³ Carmen Torres,⁴ Zita Gutiérrez-Cazares,⁵ Ygnacio Martínez-Laguna,¹ and Patricia Lozano-Zarain¹

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex isolates have been frequently associated with hospital and community infections, with *A. baumannii* being the most common. Other *Acinetobacter* spp. not belonging to this complex also cause infections in hospital settings, and the incidence has increased over the past few years. Some species of the *Acinetobacter* genus possess a great diversity of antibiotic resistance mechanisms, such as efflux pumps, porins, and resistance genes that can be acquired and disseminated by mobilizable genetic elements. By means of whole-genome sequencing, we describe in the clinical *Acinetobacter haemolyticus* strain AN54 different mechanisms of resistance that involve *bla*_{OXA-265}, *bla*_{NDM-1}, *aphA6*, *aac(6')-I_g*, and a resistance-nodulation-cell division-type efflux pump. This strain carries six plasmids, of which the plasmid pAhaeAN54e contains *bla*_{NDM-1} in a Tn125-like transposon that is truncated at the 3' end. This strain also has an insertion sequence IS91 and seven genes encoding hypothetical proteins. The pAhaeAN54e plasmid is nontypable and different from other plasmids carrying *bla*_{NDM-1} that have been reported in Mexico and other countries. The presence of these kinds of plasmids in an opportunistic pathogen such as *A. haemolyticus* highlights the role that these plasmids play in the dissemination of antibiotic resistance genes, especially against carbapenems, in Mexican hospitals.

Keywords: *A. haemolyticus*, plasmid, NDM-1, antibiotic resistance

Introduction

THE GENUS *ACINETOBACTER* INCLUDES a group of bacteria that can be isolated from a wide variety of environmental sources, including soil and water. However, some of them have become important nosocomial pathogens, such as those included within the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex. Members of this genus have been associated with severe nosocomial and community infections with high mortality rates. Nevertheless, isolates of other non-*baumannii* spp. have gained medical relevance because

of their increased frequency in recent years, for example, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter parvus*, and *Acinetobacter junii*.¹⁻³

Acinetobacter spp. have developed resistance to multiple classes of antimicrobial agents, including broad-spectrum cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones, and aminoglycosides. This resistance is due to multiple mechanisms, such as resistance-nodulation-cell division (RND)-type efflux pumps, CarO porin, and resistance genes. In addition, the ability of *Acinetobacter* spp. to acquire mobilizable

¹Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

²Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

³Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España.

⁴Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España.

⁵Hospital para el Niño Poblano, Puebla, México.

Part of these results were presented at the XXIV Latin-American Congress of Microbiology, Santiago, Chile, November 13–16, 2018.

© Elena Bello-López et al., 2019; Published by Mary Ann Liebert, Inc. This Open Access article is distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

elements that carry antibiotic resistance genes increases the resistance dissemination.^{4–6} In particular, *bla*_{NDM-1}, which encodes the New Delhi Metallo- β -lactamase-1 (NDM-1), hydrolyzes a broad spectrum of β -lactam antibiotics, including carbapenems, and is among the most worrisome resistance determinants that have spread around the world, severely complicating the treatment of nosocomial infections.^{7–10} In Latin America, its presence has been reported in Enterobacteriaceae isolates such as *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Providencia rettgeri*,^{11–13} and in non-fermentative bacilli, such as *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter bereziniae*, and *A. haemolyticus*.^{14–17} In this work, we report the presence of diverse antibiotic resistance genes in a strain of *A. haemolyticus* obtained from a Mexican pediatric patient and the characterization of the complete plasmid carrying *bla*_{NDM-1} isolated from this strain.

Materials and Methods

Bacterial isolation

Acinetobacter haemolyticus AN54 was recovered from peritoneal dialysis fluid culture from a 12-year-old male patient who had been admitted to the hospital for end-stage renal disease in February 2016. The patient was previously treated with ceftriaxone (CRO) and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT). The isolate was identified with the VITEK 2 system (bioMérieux) and molecular typing by sequencing of the *rpoB* gene.^{18,19}

Antimicrobial susceptibility testing

An antimicrobial susceptibility test was performed by using the agar disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines.²⁰ The following antimicrobials were tested: piperacillin (PIP), ticarcillin (TIC), ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, ticarcillin-clavulanic acid (TIM), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), cefotaxime (CTX), CRO, imipenem (IPM), meropenem (MEM), gentamicin, amikacin (AN), tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, and SXT. The minimal inhibitory concentration (MIC) for CTX, CAZ, FEP, MEM, IPM, and AN was determined by the agar dilution method.²⁰ Metallo- β -lactamase (MBL) detection was performed by IPM and MEM disks supplemented with 10 μ L of 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid.²¹

Test of the activity of the efflux pump in antibiotic resistance

The activity of the efflux pump was evaluated by using phenylalanine-arginine β -naphthylamide (Sigma-Aldrich) as an efflux pump inhibitor (EPI). The test was performed as follows: MICs for AN, CTX, and MEM were determined by the agar dilution method in the presence and absence of EPI (25 mg/L). A twofold or greater decrease in MIC in the presence of EPI was considered indicative of a role of RND-type efflux pumps in the resistance to the antibiotics tested. Test veracity was checked by using the strain *Acinetobacter haemolyticus* HNP11 as a positive control. To evaluate the effect of EPI on bacterial growth, all bacteria were cultured in Mueller–Hinton broth with and without EPI (25 mg/L).²²

Whole-genome sequencing and data analysis

A high-quality draft genome sequence from isolate AN54 was obtained by using an Illumina MiSeq platform (2 \times 300 paired-end reads) (IBT-UNAM) and one SMRT cell of PacBio RS II system (Yale Center for Genome Analysis). With data obtained from both platforms, a hybrid assembly was performed with the Unicycler assembler version 0.4.1,²³ and SPAdes version 3.11.1.²⁴ ResFinder 2.1²⁵ was used to identify and determine the location of antibiotic resistance genes. MAUVE version 20150226,²⁶ CLC Sequence Viewer 8.0 and BLAST were used to align and compare sequences. EASYFIG 2.2.2 was used to draw figures.²⁷

Pulsed-field gel electrophoresis and Southern blot

The S1 nuclease-pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method was carried out to determine the plasmids number by using the *Escherichia coli* strain NCTC 50192 as a reference. To detect the resistance gene in the plasmid, the PFGE gel was transferred to a nylon membrane (Hybond-N; GE Healthcare Life Sciences), and hybridization was performed with the Dig-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

Conjugation assays

Conjugation assays from AN54 to recipient strains *Escherichia coli* C600 (rifampicin resistant) and *Escherichia coli* DH5 α (nalidixic acid resistant) were performed. Mueller–Hinton agar plates (BD Bioxon) supplemented with rifampicin (100 μ g/mL) or nalidixic acid (32 μ g/mL) containing AN (32 μ g/mL) and MEM (8 μ g/mL) were used for the selection of transconjugant strains.

Nucleotide sequence accession numbers. Draft genome and plasmid sequences of the AN54 strain were deposited in the GenBank database, with accession numbers CP041224.1 to CP041229.1.

Results

In this work, we report the identification of an *Acinetobacter haemolyticus* (AN54) strain resistant to carbapenems, which was isolated from peritoneal dialysis fluid. This strain was initially identified as *Acinetobacter* spp. by a VITEK 2 System and subsequently reclassified as *A. haemolyticus* by analysis of the *rpoB* gene. The AN54 strain exhibited resistance to AN, and to the broad-spectrum β -lactams antibiotics, except for TIM. The *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-265} were previously detected by PCR and sequencing. A twofold decrease in the MIC for AN and no change in the MICs for CTX and MEM in the presence of EPI were observed. In addition, the phenotypic test to detect MBL production was positive (Table 1).

Plasmid DNA extraction revealed that the AN54 isolate carries six different bands. Southern blot hybridization indicated that *bla*_{NDM-1} was present in one of the plasmids (Fig. 1).

Whole-genome sequencing analysis revealed that AN54 possess a chromosome with a size of \sim 3.61 Mbp, and we obtained the complete sequence of four plasmids named

TABLE 1. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES TEST AND GENOTYPE OF *ACINETOBACTER HAEMOLYTICUS* AN54

Strain	Anatomical site	Resistance phenotype	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					Genotype ^a	Efflux pumps genes ^b
			CAZ	FEP	IPM	CTX + EPI	MEM + EPI		
AN54	Peritoneal dialysis fluid	PIP, TIC, SAM, TZP, CAZ, FEP, CTX, CRO, IPM, MEM, AN	>128	>128	>128	>128 (>128)	>128 (>128)	64 (32)	<i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-265} , <i>aphA6</i> , <i>aac(6')</i> -Ig <i>adeA</i> , <i>adeB</i> , <i>adeC</i> , <i>adeI</i> , <i>adeK</i> , <i>adeS</i> , <i>adeR</i> , <i>macA</i> , <i>macB</i>

Control strain *Acinetobacter haemolyticus* HNP11 MIC values: CTX: 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CTX + EPI: 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AN: 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AN + EPI: 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

^aObtained by PCR and whole-genome sequencing analysis.

^bRegulators of AdeABC efflux pump.

AN, amikacin; CAZ, ceftazidime; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; EPI, efflux pumps inhibitor (phenylalanine-arginine- β -naphthylamide) (PA β N) 25 mg/L; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem; MIC, minimal inhibitory concentration; PIP, piperacillin/sulbactam; TIC, ticarcillin; TZP, piperacillin/tazobactam.

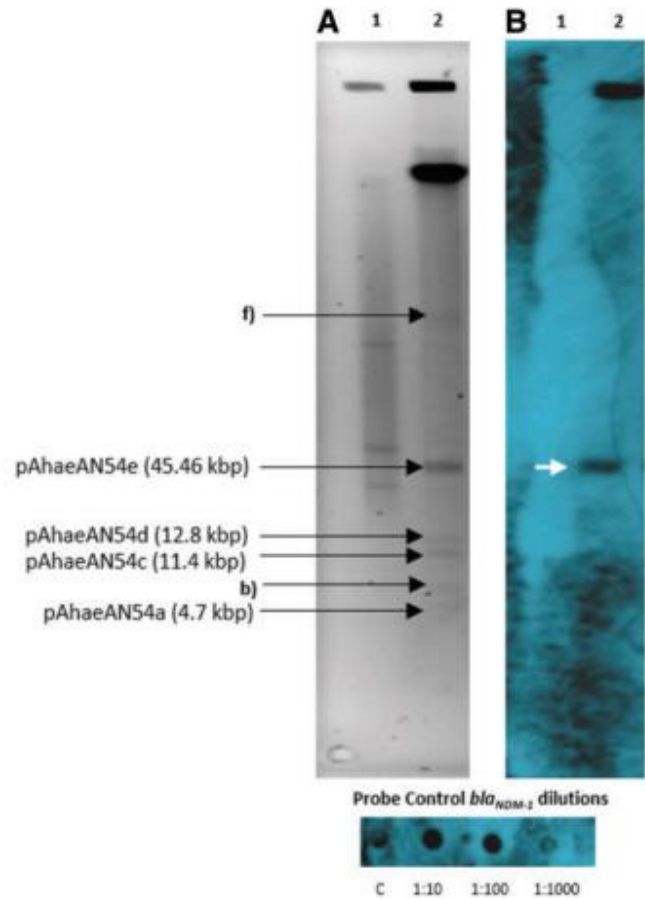


FIG. 1. (A) PFGE-S1 gel showing the plasmids of *Acinetobacter haemolyticus* AN54 strain, Line 1: Control strain *Escherichia coli* NCTC 50192, Line 2: AN54. (B) Hybridization autoradiography with the *bla*_{NDM-1} probe (DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche). The white arrow indicates that *bla*_{NDM-1} was detected in the plasmid pAhaeAN54e. The plasmid sizes were determined by WGS. PFGE, pulsed-field gel electrophoresis. Color images are available online.

pAhaeAN54a (4.7 kbp), pAhaeAN54c (11.4 kbp), and pAhaeAN54d (12.8 kbp) that do not carry antimicrobial resistance genes, and pAhaeAN54e (45.46 kbp) that carries *bla*_{NDM-1} and *aphA6*. In the chromosome, we detected the presence of *bla*_{OXA-265} and the aminoglycoside-modifying enzyme-encoding gene *aac(6')*-Ig. In addition, genes for efflux pumps and their regulators that mediate multidrug resistance were found: *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeI*, *adeK*, *adeR*, *adeS*, *macA*, and *macB*, as well as heavy metal resistance genes *czcA* and *arsH*.

The *bla*_{NDM-1} was located in the 45.46 kbp plasmid, which we named pAhaeAN54e. This plasmid has a 41% guanine-cytosine content and 53 open reading frames. Sixteen of these genes are related to plasmid maintenance and transfer functions (plasmid backbone) and include the plasmid-partitioning genes *parA* and *parB*, and transfer genes *traA*, *traC*, and *traD*, as well as some genes of the type IV secretion system (T4SS). Twelve genes of this plasmid are located within the composite transposon carrying *bla*_{NDM-1}, and the remaining genes encode 25 hypothetical

proteins. Conjugation assays were performed to test the transferability of this plasmid; however, no transconjugants were obtained under the tested conditions.

Plasmid pAhaeAN54e has 99% nucleotide identity, with 100% coverage, to plasmids pNDM-BJ02 (accession no. JQ060896.1) and pNDM-BJ01 (accession no. JQ001791.1) of *A. lwoffii*.²⁸ Figure 2 shows the detected differences, especially the insertion of seven genes encoding hypothetical proteins along the T4SS gene cluster, near the *parA* and *traA* genes, and a deletion of a hypothetical protein upstream of *traC*. The pAhaeAN54e plasmid also has a truncated composite transposon that is similar to transposon Tn125. Both these transposons consist of the IS*Aba14* insertion sequence and the *aphA6*, *bla_{NDM-1}*, *ble*, and *trpF* genes, but in contrast to Tn125, the truncated transposon of strain AN54 has only one copy of the insertion sequence IS*Aba125*. The structure of the truncated transposon is similar to that found in plasmid pNDM-BJ02 and to the partially sequenced plasmids pABC7926 (accession no. JQ080305.2) and pNDM-69122 (accession no. LN611576.1) of *A. haemolyticus* (Fig. 3).^{29,30}

Plasmid pAhaeAN54e contains an IS*91* family transposase, which is 330 bp larger than the *insE* transposase gene carried on the pNDM-BJ02 and pNDM-BJ01 plasmids in *A. lwoffii*. In addition, pAhaeAN54e has an insertion of two genes encoding hypothetical proteins downstream of IS*91* and one more that is adjacent to the recombinase gene.

Interestingly, plasmid pAhaeAN54e has 99% identity with more than 73% of coverage with the *P. rettgeri* plasmid p06-1619-NDM (accession no. KX832928.1) reported in Mexico (Fig. 4).³¹ These plasmids share 33 genes, including *traA*, *traC*, *traD*, and genes from the type IV secretion system. Plasmid p06-1619-NDM also has a Tn125-like element.

Discussion

A. baumannii is one of the principal etiological agents causing nosocomial infections in Mexico and the rest of the world.³²⁻³⁴ In Mexican hospitals, there are a few reports of carbapenem-resistant *Acinetobacter* isolates that are not included in the *A. calcoaceticus-baumannii* complex,¹⁷ possibly because the molecular typing of these species is not routinely implemented in Mexican hospitals. In this work, we studied the resistome of an *A. haemolyticus* strain resistant to carbapenems. The strain carries different resistance mechanisms, such as *bla_{OXA-265}*, which is a member of the *bla_{OXA-214}*-like family on the *A. haemolyticus* chromosome.³⁵ The strain also harbors aminoglycoside-modifying enzyme genes, such as *aac(6')-I_g*, which is responsible for AN resistance and belongs to the AAC(6')-I aminoglycoside N-acetyltransferase family reported in *Acinetobacter* spp.,^{36,37} and *aphA6*, which confers resistance to AN and is associated with the presence of *bla_{NDM-1}* in a plasmid from this strain, as has been reported in another study.³⁸

Another antibiotic resistance mechanism studied in *A. baumannii* is the use of efflux pumps, mainly the RND family of efflux pumps, such as the AdeABC and AdeIJK systems, which are located on the bacterial chromosome. This family exhibits a wide substrate range that includes dyes, biocides, detergents, and antiseptics; however, its presence has been little studied in non-*baumannii* spp.³⁹ The

overexpression of this system was shown to be responsible for decreasing susceptibility to a broad spectrum of antimicrobials, such as aminoglycosides, tetracyclines, erythromycin, chloramphenicol, trimethoprim, fluoroquinolones, some β -lactams, and ethidium bromide, and has recently also been associated with tigecycline.⁴⁰ The genes that encode the AdeABC efflux pump are organized in an operon (*adeABC*). There are two regulatory genes, *adeS* and *adeR*, and their products are closely related to proteins of the two-component regulatory system. These genes regulate efflux pump expression in response to cellular environment stimuli (antibiotics). This type of expression is called inductive.⁴¹

AdeIJK encoded by the *adeIJK* operon is the second RND efflux system described in *A. baumannii*,⁴² which contributes to the resistance to β -lactams, such as TIC, cephalosporins, aztreonam, fluoroquinolones, tetracyclines, tigecycline, lincosamides, rifampicin, and chloramphenicol; however, aminoglycosides are not substrates for this pump.⁴³ The *Acinetobacter haemolyticus* AN54 strain contains homologues of the regulator proteins AdeS and AdeR and the efflux pump components AdeA, AdeB and AdeC with the *Acinetobacter baumannii* AYE strain, these proteins share an amino acid identity of 72%, 85%, 86%, 92% and 77% respectively, to the corresponding proteins. In addition, homologues of AdeI and AdeK proteins with 82% and 89% identity with *Acinetobacter baumannii* AYE were also found. However, the AdeJ subunit in strain AN54 was not located.

In this work, EPI was used to evaluate the role of the efflux pump in antibiotic resistance. The results obtained indicate that the efflux pump only participates in conferring resistance to AN, as shown by a twofold decrease in the MIC (from 64 to 32 μ g/mL). The strain did not show a decrease in the MICs of CTX and MEM, possibly due to the presence of *bla_{NDM-1}*.⁶

The presence of *bla_{NDM-1}* in a non-*baumannii* spp. of environmental origin such as *A. haemolyticus* is medically and epidemiologically relevant. This is especially true considering the lack of successful treatment for patients with some underlying diseases and the ease of *bla_{NDM-1}* dissemination through complex recombination events mediated by insertion sequences, transposons, and plasmids, as reported in previous works.^{31,44,45}

The *Acinetobacter haemolyticus* AN54 strain harbors *bla_{NDM-1}* within a Tn125-like transposon in a plasmid highly similar to pNDM-BJ02 of *A. lwoffii*, which has been previously reported in China.²⁸ The backbone of the plasmids carrying *bla_{NDM-1}* between *Acinetobacter* spp. is relatively conserved; however, one difference found in our plasmid is the presence of IS*91*. This gene is designated as ISCR, and one of its functions is the mobilization of additional sequences upstream of the transposase gene.^{46,47} The second difference is the insertion of seven genes encoding hypothetical proteins in the putative conjugation region; the function of these proteins is yet unknown. Currently, there are no methodologies to characterize this kind of replicon, due to the absence of a typical Rep protein, such as the one presented by Enterobacteriaceae plasmids, indicating that these plasmids possess an uncharacterized replication system; therefore, additional studies are needed. No transconjugants were obtained under the tested conditions. However, we cannot exclude other alternative mechanisms of plasmid

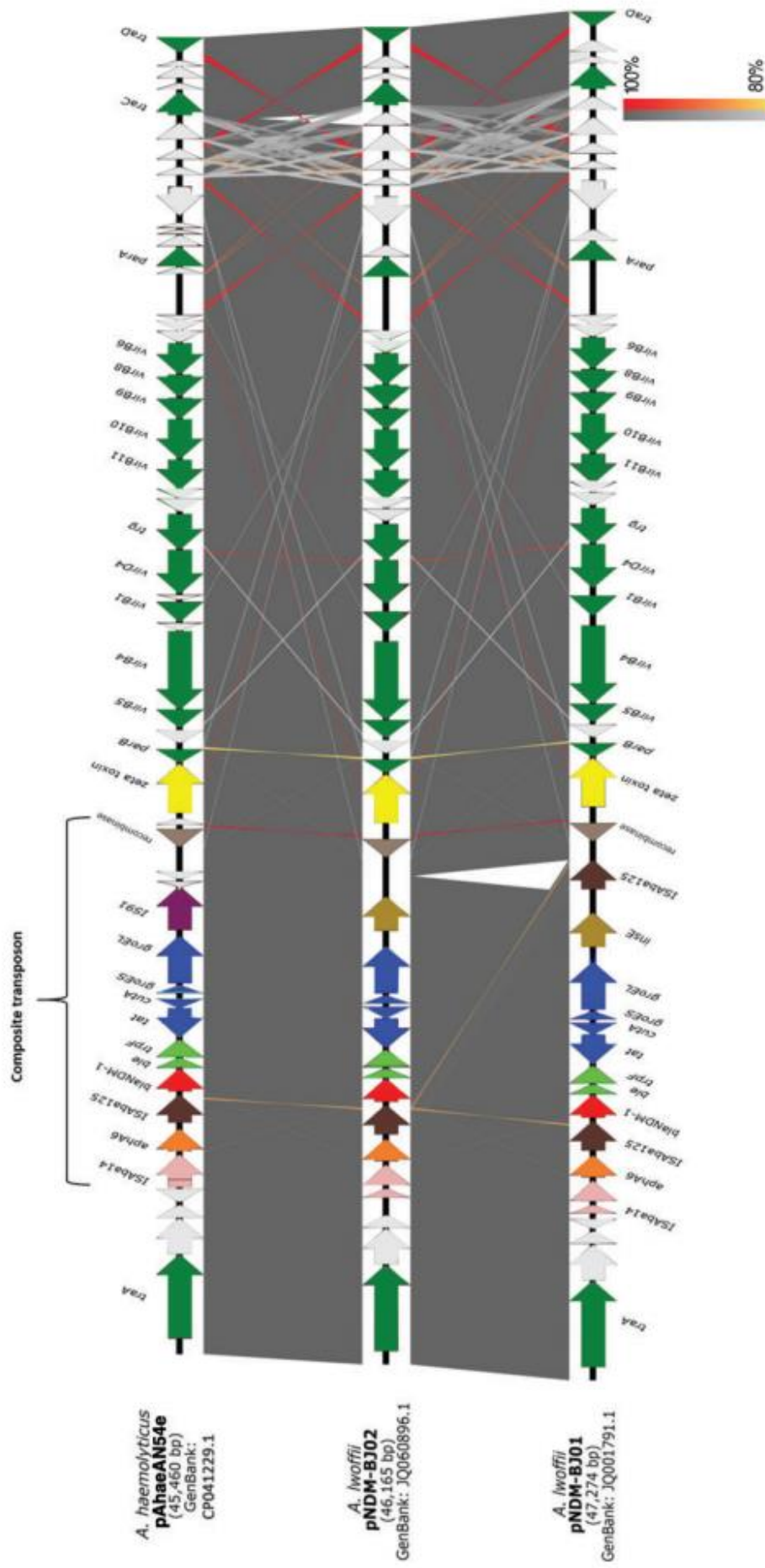


FIG. 2. The schematic representation and alignment of plasmid pAhaeAN54e of *Acinetobacter baumannii* and plasmids pNDM-BJ02 and pNDM-BJ01 of *Acinetobacter baumannii* are divided into two sections: the composite transposon in which ISAbal25, blaNDM-1, and IS91 are inserted and the putative conjugation machinery. The known genes are marked in green, and putative proteins are marked in white. The gray bars indicate 99% identity, and the inverted regions are indicated in red. Color images are available online.

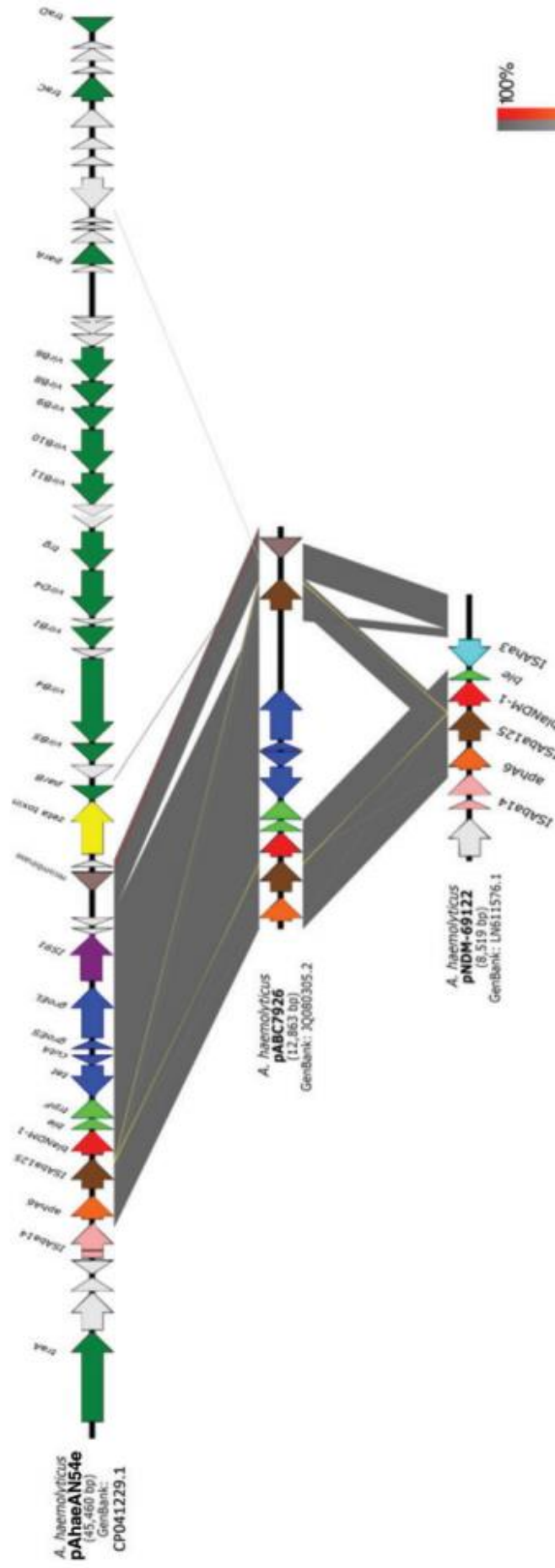


FIG. 3. Comparison between the plasmid pAhaeAN54e and the partially sequenced plasmids pABC7926 and pNDM69122 of *Acinetobacter haemolyticus*. Color images are available online.

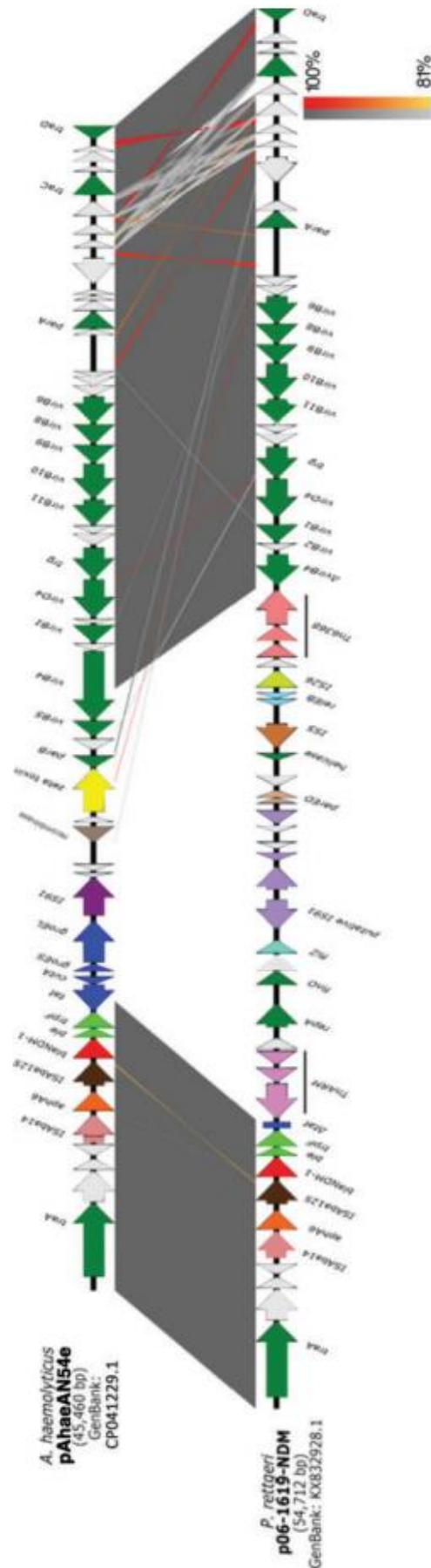


FIG. 4. Comparison between plasmids pAhaeAN54e of *Acinetobacter haemolyticus* and p06-1619-NDM of *Providencia rettgeri*, both of which are isolated from México. Color images are available online.

transference, as reported in other studies of *Acinetobacter* spp. carrying *bla*_{NDM-1}.^{14,15,38,48}

Recently, Duran-Bedolla *et al.*¹⁷ partially reported the genetic context of *bla*_{NDM-1} in strains of *Acinetobacter* spp., including the *Acinetobacter haemolyticus* 10256 strain isolated in a different geographical area of Mexico. The plasmid reported in our work showed specific differences in comparison with the plasmid of *Acinetobacter haemolyticus* 10256 (55 kbp plasmid); these included size (45.4 kbp), absence of *ISAbal25* sequence in the 3' end, presence of genes encoding hypothetical proteins along the structure of the plasmid, and *IS91* instead of *ISCR27*. These results suggest that the genetic context of *bla*_{NDM-1} in *A. haemolyticus* is partially conserved.^{17,29,30}

Our study shows that plasmid pAhaeAN54e has a high similarity with plasmid p06-1619-NDM of *P. rettgeri* and, as noted by Marquez-Ortiz *et al.*,³¹ the similarities among pNDM-BJ01-like plasmids and plasmids of *P. rettgeri* may be the result of recombination events that lead to a chimeric plasmid that can be transmitted and replicated among Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* isolates.⁴⁹

Concluding Remarks

In this study, we report a multidrug-resistant clinical *A. haemolyticus* strain isolated from a pediatric patient carrying *bla*_{NDM-1} in a novel variant of pNDM-BJ01-like plasmids. This plasmid could constitute a dissemination mechanism of antimicrobial resistance genes among diverse bacterial species. The findings reported in this work contribute to providing information about the diverse mechanisms of resistance that can coexist in *A. haemolyticus* strains.

Acknowledgments

The authors thank Liliana López-Pliego, PhD and Ángeles Pérez-Oseguera, MS for technical support in the laboratory. This work was funded by Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, VIEP grant numbers: LOZP-NAT17-I and VIEP/2497/16 and partially supported by "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT" (IN200318). Bello-López and Castro-Jaimes received Doctoral fellowships from CONACyT México with numbers: 273320 and 606188, respectively.

Ethical Statement

Acinetobacter haemolyticus AN54 isolate was collected during routine sampling, and patient data were anonymized. The protocol for this study was approved by the Ethical Committee of Hospital number: HNP/ENS/177/2016.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Peleg, A.Y., A. de Brij, M.D. Adams, G.M. Cerqueira, S. Mocali, M. Galardini, P.H. Nibbering, A.M. Earl, D.V. Ward, D.L. Paterson, H. Seifert, and L. Dijkshoorn. 2012. The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One*. 7:e46984.

2. Touchon, M., J. Cury, E.-J. Yoon, L. Krizova, G.C. Cerqueira, C. Murphy, M. Feldgarden, J. Wortman, D. Clermont, T. Lambert, C. Grillot-Courvalin, A. Nemeč, P. Courvalin, and E.P.C. Rocha. 2014. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol. Evol.* 6: 2866–2882.
3. Wong, D., T.B. Nielsen, R.A. Bonomo, P. Pantapalangkoor, B. Luna, and B. Spellberg. 2017. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 30:409–447.
4. Esterly, J., C.L. Richardson, N.S. Eltoukhy, C. Qi, and M.H. Scheetz. 2011. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Ann. Pharmacother.* 45:218–228.
5. Traglia, G.M., M. Almuzara, E. Vilacoba, A. Tuduri, G. Neumann, E. Pallone, D. Centrón, and M.S. Ramfrez. 2014. Bacteremia caused by an *Acinetobacter junii* strain harboring class 1 integron and diverse DNA mobile elements. *J. Infect. Dev. Ctries.* 8:666–669.
6. Rumbo, C., E. Gato, M. López, C. Ruiz de Alegría, F. Fernández-Cuenca, L. Martínez-Martínez, J. Vila, J. Pachón, J.M. Cisneros, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual, G. Bou, and M. Tomás. 2013. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5247–5257.
7. Berrazeg, M., S.M. Diene, L. Medjahed, P. Parola, M. Drissi, D. Raoult, and J.M. Rolain. 2014. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: An eReview using Google Maps. *Euro. Surveill.* 19:pii: 20809.
8. Shahid, M. 2011. Environmental dissemination of NDM-1: time to act sensibly. *Lancet Infect. Dis.* 11:334–335.
9. Roca, I., P. Espinal, X. Vila-Farrés, and J. Vila. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3:148.
10. Robledo, I.E., E.E. Aquino, M.I. Santé, J.L. Santana, D.M. Otero, C.F. León, and G.J. Vázquez. 2010. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1354–1357.
11. Pasteran, F., E. Albornoz, D. Faccone, S. Gomez, C. Valenzuela, M. Morales, P. Estrada, L. Valenzuela, J. Matheu, L. Guerrero, E. Arbizu, Y. Calderon, P. Ramon-Pardo, and A. Corso. 2012. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1795–1797.
12. Torres-González, P., M. Bobadilla-Del Valle, E. Tovar-Calderón, F. Leal-Vega, A. Hernández-Cruz, A. Martínez-Gamboa, M.D. Niembro-Ortega, J. Sifuentes-Osornio, and A. Ponce-de-León. 2015. Outbreak caused by Enterobacteriaceae harboring NDM-1 metallo- β -lactamase carried in an IncFII plasmid in a tertiary care hospital in Mexico City. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:7080–7083.
13. Carvalho-Assef, A.P.D., P.S. Pereira, R.M. Albano, G.C. Beriao, T.P.G. Chagas, L.N. Timm, R.C.F. Da Silva, D.R. Falci, and M.D. Asensi. 2013. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:2956–2957.
14. Pasteran, F., M.M. Mora, E. Albornoz, D. Faccone, R. Franco, J. Ortellado, N. Melgarejo, S. Gomez, I. Riquelme, J. Matheu, P. Ramon-Pardo, and A. Corso. 2014. Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:2575–2578.
15. Brovedan, M., P.M. Marchiaro, J. Morán-Barrio, M. Cameranesi, G. Cera, M. Rinaudo, A.M. Viale, and A.S. Limansky. 2015. Complete sequence of a *bla*_(NDM-1) harboring plasmid in an *Acinetobacter bereziniae* clinical strain isolated in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:6667–6669.
16. Pilonetto, M., L. Arend, E.C. Vespero, M. Pelisson, T.P.G. Chagas, A.P.D. Carvalho-Assef, and M.D. Asensi. 2014. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:7592–7594.
17. Duran-Bedolla J., P. Bocanegra-Ibarias, J. Silva-Sánchez, E. Garza-González, R. Morfín-Otero, R. Hernández-Castro, L. Lozano, U. Garza-Ramos, and H. Barrios-Camacho. 2018. Genetic characterization of multiple NDM-1-producing clinical isolates in Mexico. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 94:195–198.
18. Gundi, V.A., L. Dijkshoorn, S. Burignat, D. Raoult, and B. La Scola. 2009. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology.* 155:2333–2341.
19. La Scola, B., V.A.K.B. Gundi, A. Khamis, and D. Raoult. 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 44:827–832.
20. Clinical Laboratory Standards Institute. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. Bonnin, R.A., T. Naas, L. Poirel, and P. Nordmann. 2012. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 50:1419–1421.
22. López-García, A., R.C. Rocha-Gracia, E. Bello-López, C. Juárez-Zelocualtecal, Y. Sáenz, M. Castañeda-Lucio, L. López-Pliego, M.C. González-Vázquez, C. Torres, T. Ayala-Núñez, G. Jiménez-Flores, M.M. de la Paz Arenas-Hernández, and P. Lozano-Zarain. 2018. Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. *Infect. Drug Resist.* 11: 1523–1536.
23. Wick, R.R., L.M. Judd, C.L. Gorrie, and K.E. Holt. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13: e1005595.
24. Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov, V.M. Lesin, S.I. Nikolenko, S. Pham, A.D. Prjibelski, A.V. Pyshkin, A.V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M.A. Alekseyev, and P.A. Pevzner. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19: 455–477.
25. Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen, O. Lund, F.M. Aarestrup, and M.V. Larsen. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2640–2644.
26. Darling, A.C.E., B. Mau, F.R. Blattner, and N.T. Perna. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14:1394–1403.

27. Sullivan, M.J., N.K. Petty, and S.A. Beatson. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 27:1009–1010.
28. Hu, H., Y. Hu, Y. Pan, H. Liang, H. Wang, X. Wang, Q. Hao, X. Yang, X. Yang, X. Xiao, C. Luan, Y. Yang, Y. Cui, R. Yang, G.F. Gao, Y. Song, and B. Zhu. 2012. Novel Plasmid and its variant harboring both a *bla*_{NDM-1} gene and type IV secretion System in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1698–1702.
29. Jones, L.S., M.J. Carvalho, M.A. Toleman, P.L. White, T.R. Connor, A. Mushtaq, J.L. Weeks, K.K. Kumarasamy, K.E. Raven, M.E. Török, S.J. Peacock, R.A. Howe, and T.R. Walsh. 2015. Characterization of plasmids in extensively drug-resistant *Acinetobacter* strains isolated in India and Pakistan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59:923–929.
30. Fu, Y., L. Liu, X. Li, Y. Chen, Y. Jiang, Y. Wang, Y. Yu, and X. Xie. 2015. Spread of a common *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. *Infect. Genet. Evol.* 32:30–33.
31. Marquez-Ortiz, R.A., L. Haggerty, N. Olarte, C. Duarte, U. Garza-Ramos, J. Silva-Sanchez, B.E. Castro, E.M. Sim, M. Beltran, M.V. Moncada, A. Valderrama, J.E. Castellanos, I.G. Charles, N. Vanegas, J. Escobar-Perez, and N.K. Petty. 2017. Genomic epidemiology of NDM-1-encoding plasmids in Latin American clinical isolates reveals insights into the evolution of multidrug resistance. *Genome Biol. Evol.* 9:1725–1741.
32. Bocanegra-Ibarias, P., C. Peña-López, A. Camacho-Ortiz, J. Llaca-Díaz, J. Silva-Sánchez, H. Barrios, U. Garza-Ramos, A.M. Rodríguez-Flores, and E. Garza-González. 2015. Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 45:309–313.
33. Garza-González, E., J.M. Llaca-Díaz, F.J. Bosques-Padilla, and G.M. González. 2010. Prevalence of multidrug-resistant bacteria at a tertiary-care teaching hospital in Mexico: Special focus on *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy.* 56:275–279.
34. Morfín-Otero, R., M.D. Alcántar-Curiel, M.J. Rocha, C.M. Alpuche-Aranda, J.I. Santos-Preciado, C. Gayosso-Vázquez, J.R. Araiza-Navarro, M. Flores-Vaca, S. Esparza-Ahumada, E. González-Díaz, H.R. Pérez-Gómez, and E. Rodríguez-Noriega. 2013. *Acinetobacter baumannii* infections in a tertiary care hospital in Mexico over the past 13 years. *Chemotherapy.* 59:57–65.
35. Figueiredo, S., R.A. Bonnin, L. Poirel, J. Duranteau, and P. Nordmann. 2012. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:907–913.
36. Doi, Y., J.-I. Wachino, K. Yamane, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, and Y. Arakawa. 2004. Spread of novel aminoglycoside resistance gene *aac(6′)-Iad* among *Acinetobacter* clinical isolates in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2075–2080.
37. Lambert, T., G. Gerbaud, M. Galimand, and P. Courvalin. 1993. Characterization of *Acinetobacter haemolyticus aac(6′)-I_g* gene encoding an aminoglycoside 6′-N-acetyltransferase which modifies amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2093–2100.
38. Fu, Y., X. Du, J. Ji, Y. Chen, Y. Jiang, and Y. Yu. 2012. Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla*_{NDM-1} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2114–2122.
39. Chu, Y.W., S.L. Chau, and E.T.S. Houang. 2006. Presence of active efflux systems AdeABC, AdeDE and AdeXYZ in different *Acinetobacter* genomic DNA groups. *J. Med. Microbiol.* 55:477–478.
40. Gholami, M., A. Hashemi, M. Hakemi-Vala, H. Goudarzi, and M. Hallajzadeh. 2015. Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine B-naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran. *Jundishapur. J. Microbiol.* 8:e19048.
41. Wiecek, P., P. Sacha, T. Hauschild, M. Zórawski, M. Krawczyk, and E. Tryniszewska. 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*—the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem. Cytobiol.* 46:257–267.
42. Damier-Piolle, L., S. Magnet, S. Brémont, T. Lambert, and P. Courvalin. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:557–562.
43. Coyne, S., G. Guigon, P. Courvalin, and B. Périchon. 2010. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:333–340.
44. Al Atrouni, A., M.-L. Joly-Guillou, M. Hamze, and M. Kempf. 2016. Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Front. Microbiol.* 7:49.
45. Nordmann, P., L. Poirel, T.R. Walsh, and D.M. Livermore. 2011. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 19:588–595.
46. Toleman, M.A., P.M. Bennett, and T.R. Walsh. 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:296–316.
47. Toleman, M.A., and T.R. Walsh. 2010. ISCR elements are key players in IncA/C plasmid evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3534.
48. Montaña, S., R. Cittadini, M. Del Castillo, S. Uong, T. Lazzaro, M. Almuzara, C. Barberis, C. Vay, and M.S. Ramírez. 2016. Presence of New Delhi metallo-β-lactamase gene (NDM-1) in a clinical isolate of *Acinetobacter junii* in Argentina. *New Microbes New Infect.* 11: 43–44.
49. Barrios, H., U. Garza-Ramos, F. Reyna-Flores, A. Sanchez-Perez, T. Rojas-Moreno, E. Garza-Gonzalez, J.M. Llaca-Diaz, A. Camacho-Ortiz, S. Guzman-Lopez, and J. Silva-Sanchez. 2013. Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:1934–1936.

Address correspondence to:
 Patricia Lozano-Zarain, PhD
 Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas
 Instituto de Ciencias
 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
 Edificio IC-11, Ciudad Universitaria
 Colonia Jardines de San Manuel
 Puebla, Pue. CP. 72570
 México

E-mail: plozano_zarain@hotmail.com