



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN INMUNOGENICA *IN SILICO* DE LA PROTEÍNA
NDM-1 DE *Acinetobacter haemolyticus* Y CLONACIÓN DEL
GEN *bla*_{NDM-1} EN UN VECTOR DE MANTENIMIENTO

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA

PRESENTA:
PABLO PEÑA CORTÉS

DIRECTOR (A): D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN
CODIRECTOR (A): D.C. MARÍA CRISTINA GONZÁLEZ
VÁZQUEZ
ASESORES: D.C. JORGE ALEJANDRO CRUZ MERIDA
M.I.E. ELIZABETH ROJAS VALERIO



Diciembre, 2025

AGRADECIMIENTOS

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** y a la **Facultad de Ciencias Biológicas**, por brindarme las herramientas, el espacio y los recursos necesarios para mi formación profesional.

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por permitirme el desarrollo de este proyecto, así como formarme como profesional y como persona. Gracias por haberme dejado ser parte de su historia como centro de desarrollo, enseñanza, investigación e innovación.

Este estudio se realizó con recursos de **Proyectos VIEP 2024**, de su **Programa de Fortalecimiento de los Cuerpos Académicos** con el proyecto titulado “Estudio del resistoma y moviloma y el papel de las microvesículas de membrana externa en la resistencia de antibióticos de *Acinetobacter spp* y *Pseudomonas aeruginosa*” (**ID proyecto: 00168**)

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por aceptarme en el laboratorio y apoyarme en la etapa final de mi formación académica; desde el Servicio Social, Estancias de investigación, Prácticas Profesionales y el desarrollo de Tesis. Gracias por la tolerancia a mis dudas y por siempre respaldar tanto a mi como mi trabajo.

A la **D.C. María Cristina González Vázquez**, por compartirme su conocimiento y adentrarme al mundo de la Biología Molecular. Gracias por escuchar mis preguntas de cualquier tipo y ayudarme a buscar una alternativa ante las adversidades en la clonación. Gracias por su paciencia y su ayuda.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por su constante apoyo y atención hacia mí en el laboratorio. Agradezco sus sugerencias, observaciones e inquietudes, las cuales ampliaron mi perspectiva y enriquecieron mi aprendizaje.

Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, por la ayuda incondicional que siempre me brindó y a este proyecto. Gracias porque sin usted esto no hubiera sido posible

A mis hermanos académicos y amigos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad; a **Lore, Lau, Isa y Vero**, por ser las primeras personas en recibirme en el

laboratorio y enseñarme las bases para poder desarrollarme en el laboratorio. A **Erika, Aline, Diego, Mar, Diana, Toño, Cruz, Dulce y Ale**, por ser mi compañía en mi estancia en el laboratorio. Gracias por siempre compartir conmigo, brindarme su apoyo y brindarme sus conocimientos en todo momento, tanto dentro como fuera del laboratorio. Estoy profundamente agradecido por su amistad, sin duda mi tiempo por el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin ustedes. A **Elsy** por empezar siendo mi responsable de servicio social, luego mi mamá de laboratorio y finalmente mi amiga. Porque si tenía alguna duda era la primera a quien le preguntaría, pero si tenía un chisme también, gracias por todo lo que compartes conmigo y todo lo que me dejas compartir contigo.

A mis **amigos** de la **Facultad de Ciencias Biológicas**, por formar parte del inicio de esta etapa y coincidir conmigo los conocimientos elementales que después ocupé al realizar este trabajo. Gracias por compartir tareas, trabajos, exposiciones, etc., pero sobre todo gracias por siempre estar dispuestos a ayudarme.

A mi **familia**, a mis **amigas** y **amigos**, porque, aunque no formaron parte directa de este trabajo, son una parte influyente e importante en mi vida. Gracias por ser la base más cercana y significativa de mi vida. Gracias por compartir conmigo los momentos de mi vida.

Si estás leyendo esta tesis, también te agradezco. Gracias a todas las personas que forman parte de mi vida porque esto también es de ustedes.

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 <i>Acinetobacter spp.</i>	8
1.2 Resistencia a antibióticos en <i>Acinetobacter spp.</i>	9
1.3 Tipos de resistencia a los antibióticos	10
1.3.1. Resistencia intrínseca.	10
1.3.2. Resistencia adquirida.	11
1.4 Mecanismos de resistencia	11
1.4.1. Disminución de la permeabilidad de la membrana	11
1.4.2. Mutaciones en el sitio blanco	12
1.4.3. Sistema de bombas de expulsión	13
1.4.4. Creación de una vía alterna	13
1.4.5. Enzimas hidrolizadoras o modificadoras de antibióticos	14
1.5 Resistencia a beta-lactámicos	14
1.5.1. Enzimas betalactamasas	15
1.5.2. Beta-lactamasas de clase A	15
1.5.3. Beta-lactamasas de clase C	16
1.5.4. Beta-lactamasas de clase D	17
1.5.5. Beta-lactamasas de clase B	17
1.5.6. Metallo-beta-lactamasa de Nueva Delhi (NDM)	18
1.6 Transferencia de resistencia en <i>Acinetobacter spp.</i>	19
1.6.1. Transposones	19
1.6.2. Integriones	19
1.6.3. Plásmidos	20
1.7 Mecanismos de resistencia en <i>A. haemolyticus</i>	21
1.8 Inmunoinformática	22
1.8.1. C-ImmSim	23
1.9 Vectores de clonación	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPOTESIS	27
4. OBJETIVO	28
4.1 Objetivo general	28

4.2 Objetivos particulares	28
5 MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
5.1 Diseño experimental.....	29
5.2 Cepas de estudio	29
5.3 Técnicas y procedimientos	30
5.3.1. Identificación de epítopes de la proteína NDM-1 y Modelado.....	30
5.3.2 Predicciones de la toxicidad e inmunogenicidad de los epítopes	30
5.3.3. Predicciones de Antigenicidad, Alergenicidad, Toxicidad y Propiedades inmunogénicas de la proteína NDM-1.....	30
5.3.4 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de <i>bla</i> _{NDM-1}	31
5.3.5. Obtención ADN plasmídico conteniendo el plásmido pAhaeAN54e portador de <i>bla</i> _{NDM-1} de la cepa <i>A. haemolyticus</i> AN54.....	31
5.3.6. Electroforesis en gel de agarosa	32
5.3.7. Amplificación del gen <i>bla</i> _{NDM-1} por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
5.3.8. Purificación de banda de amplificado del gen <i>bla</i> _{NDM-1} en gel de electroforesis.....	34
5.3.9. Reacción de ligación de pCR2.1-TOPO y el gen <i>bla</i> _{NDM-1}	34
5.3.10. Células competentes <i>E. coli</i> Top 10	35
5.3.11. Transformación de <i>Escherichia coli</i> Top 10 con pCR2.1-TOPO :: <i>bla</i> _{NDM-1}	36
5.3.12. Comprobación de la presencia de la construcción en colonias transformantes	36
5.3.13. Digestión de ADN plasmídico obtenido de las colonias transconjugantes con enzimas de restricción	37
6 Resultados.....	38
6.1 Propiedades Inmunogénicas <i>In silico</i> de la proteína NDM - 1	38
6.2 Resultados <i>in silico</i> de la toxicidad y predicción de la inmunogenicidad de los epítopes	40
6.3 Antigenicidad, alergenidad y toxicidad <i>In silico</i> de la proteína NDM-1	42
6.4. C – ImmSim	43
6.5 Diseño de oligonucleótidos con sitios de restricción	46
6.6 Extracción del ADN plasmídico de la cepa <i>A. haemolyticus</i> AN54	47
6.7 Amplificación de <i>bla</i> _{NDM-1} a partir de la purificación plasmídica de la cepa <i>A.</i> <i>haemolyticus</i> AN54.....	48
6.8 Clonación y transformación	48
6.9 Comprobación de la construcción por restricción enzimática	50
7 Discusión.....	51

8. Conclusiones	58
9. Perspectivas.....	60
10. Referencias.....	61

RESUMEN

Acinetobacter haemolyticus es una bacteria gram negativa asociada a infecciones nosocomiales debido a la creciente adquisición de genes de resistencia a los antibióticos. Esta adquisición de genes se lleva a cabo a través de la transferencia horizontal, siendo *bla*_{NDM-1} uno de los genes importantes adquiridos. NDM-1 es una Metallo-betalactamasa de clase B que requiere zinc y que hidroliza todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos excepto aztreonam. En este estudio se trabajó *in silico* con la secuencia de la proteína NDM-1, utilizando herramientas bioinformáticas para predecir los posibles epítopes de activación de linfocitos B y T, así como predecir su antigenicidad, alergenicidad, toxicidad, y la posible respuesta inmune generada. Con base a los resultados *in silico*, se construyó un vector de clonación con el gen *bla*_{NDM-1}, y el vector pCR2.1-TOPO. Los resultados mostraron que la proteína NDM-1 no es alergena y no es tóxica, se obtuvieron siete posibles epítopes para linfocitos B y cuatro para linfocitos T los cuales se encontraron no ser tóxicos y ser inmunogénicos. Mediante un análisis estructural de la proteína, se observaron que todos los epítopes estaban expuestos menos uno. Las inmunizaciones *in silico* con la proteína arrojaron un perfil de inmunoglobulinas alto en IgG e IgM y de citocinas, siendo mayor para IFN- γ e IL-2. Con base a estos resultados, se realizó la construcción estable del vector de clonación pCR2.1-TOPO y el gen *bla*_{NDM-1}. En el presente trabajo describimos las propiedades inmunológicas de la proteína NDM-1 *In silico*, observando que es inmunogénica no alergena y no tóxica para su administración en un biomodelo. Por lo cual la proteína NDM-1 puede ser utilizada para generar anticuerpos policlonales en un biomodelo. Con base a estos resultados se obtuvo el vector de clonación pCR2.1-TOPO::*ndm-1*, que posteriormente se utilizara para la construcción de un vector de expresión.

Palabras clave: *Acinetobacter*, NDM-1, inmunobioinformática, vector de clonación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Acinetobacter* spp.

El término “*Acinetobacter*” proviene del griego “*akinetos*”, que significa “no móvil”. Aunque estas bacterias no son móviles, presentan un tipo de movimiento impredecibles. En los últimos años, el interés por las bacterias del género *Acinetobacter* ha aumentado notablemente, principalmente debido a dos razones: su capacidad para causar infecciones nosocomiales graves y su habilidad para desarrollar resistencia a múltiples fármacos e incluso resistencia extrema a fármacos (Knapp *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 2008; Vanbroekhoven *et al.*, 2004).

Las bacterias del género *Acinetobacter* presentan una serie de características distintivas que facilitan su identificación presuntiva a nivel de género. Se trata de cocobacilos gram negativos, aerobios estrictos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no móviles y no fermentadores (Baumann *et al.*, 1968; Vallenet *et al.*, 2008). En la tinción de Gram, estas bacterias aparecen como bacilos cortos y robustos, que pueden ser difíciles de decolorar, lo que puede llevar a errores en su identificación, confundiéndolas con otros cocos gram negativos o incluso gram positivos (Allen y Hartman, 2000).

El género *Acinetobacter* actualmente está formado por 87 especies, dentro de estas, hay seis especies fenotípicamente semejantes, siendo agrupadas en el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (Acb), siendo las especies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. lactucae*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* y *A. seifertii* (Mancilla-Rojano *et al.*, 2024). Las pruebas fenotípicas y bioquímicas convencionales (p.e. tinción de gram, cultivo o pruebas bioquímicas) utilizadas en los laboratorios no son capaces de diferenciar a las especies del complejo Acb, para lo cual se requieren pruebas moleculares (p.e. PCR o secuenciación) (Bergogne-Bérézin y Tower, 1996; Peleg *et al.*, 2008).

La alta frecuencia de aislamiento de *A. baumannii* y del complejo Acb en entornos hospitalarios ha hecho que se considere como uno de los patógenos nosocomiales con mayor relevancia, causante de brotes e infecciones relacionadas con la atención

sanitaria. Esta capacidad de persistir se les ha atribuido a algunas características como la habilidad de sobrevivir durante largos periodos en superficies y una alta resistencia a agentes antimicrobianos (Chapartegui-González *et al.*, 2018; Vázquez-López *et al.*, 2020).

Por otra parte, las especies fuera de *Acb* conforman el complejo no-*baumannii*, donde *A. lwoffii*, *A. courvalinii*, *A. johnsonii* y *A. bereziniae*, se han reconocido recientemente causantes de infecciones en medicina veterinaria (Marí *et al.*, 2017). Sin embargo, algunas otras especies como *A. haemolyticus*, *A. junni*, *A. johnsonii* y *A. lwoffii* se han identificado como causantes de infecciones en paciente inmunocomprometidos (Atrouni *et al.*, 2016). En los últimos años, *A. haemolyticus* ha cobrado relevancia debido a la adquisición de metalo-beta-lactamasas (MBL) como *bla*_{NDM-like} y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) además de poseer otros mecanismos de resistencia, como bombas de eflujo, que provocan la adaptación de las bacterias en el entorno hospitalario, lo que complica su tratamiento y erradicación (Perichón *et al.*, 2014; Bello-López *et al.*, 2020).

1.2 Resistencia a antibióticos en *Acinetobacter* spp.

El principal desafío con *Acinetobacter* spp. es su elevada resistencia frente a distintos antibióticos (Landman *et al.*, 2002). Estos microorganismos muestran una resistencia frecuente a varios medicamentos como la ampicilina, cefalotina, carbenicilina, gentamicina, amikacina, cloranfenicol, tetraciclina, cotrimoxazol, ciprofloxacino y cefoperazona (Savov *et al.*, 2002). Sin embargo, la creciente resistencia a estos antibióticos ha complicado seriamente el manejo de estas infecciones, generando preocupación a nivel global (Doughari *et al.*, 2009; Grotiuz *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007). *A. baumannii*, en particular, ha mostrado una evolución significativa en su resistencia a prácticamente todos los antibióticos empleados en su tratamiento. Hoy en día, la mayoría de las cepas de *A. baumannii* presentan resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas, cefalosporinas, ampicilinas, cefotaxima, cloranfenicol, gentamicina y tobramicina, y de forma alarmante a los carbapenémicos (Prashanth y Badrinath, 2005). Así lo reportaron Tocanelli *et al.*, en 2018 ya que en la lista de patógenos prioritarios de la Organización

Mundial de la Salud (WHO, 2017) para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos ha sido designada como patógeno crítico de prioridad 1 (Tacconelli *et al.*, 2018).

En *A. haemolyticus* se ha reportado la resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas, ciproflaxina y aminoglucósidos en cepas aisladas en un hospital de la ciudad de Puebla, México (Bello-López *et al.*, 2020). También a netilmicina, tobramicina y niveles bajos de amikacina (Espinal *et al.*, 2011) Es importante destacar la resistencia a los antibióticos de diversas familias como son aminoglucósidos, quinilonas, betalactámicos y en especial a carbapenémicos dado que son la última opción de tratamiento en infecciones hospitalarias causadas por *Acinetobacter*, sobre todo en países de bajos recursos. Esta resistencia es debida a diferentes mecanismos tanto intrínsecos como adquiridos.

1.3 Tipos de resistencia a los antibióticos

1.3.1. Resistencia intrínseca.

La resistencia intrínseca puede definirse como un rasgo que comparten universalmente algunas especies bacterianas y que es independiente de la exposición previa a antibióticos (Galgano *et al.*, 2025). En este tipo de resistencia, la causa no está relacionada con el uso de antibióticos, sino con las características estructurales propias de la bacteria (Kadhum y Hasan, 2019). La resistencia intrínseca a los antibióticos puede prolongar la duración del tratamiento, provocar el fracaso de este y favorecer la generación de resistencia adquirida en los pacientes tratados (Espinal *et al.*, 2006). Esto sucede ya sea porque el microorganismo no presenta la estructura objetivo del antibiótico o porque las características del antibiótico impiden que alcance su objetivo (Waglechner y Wright, 2017). Por ejemplo, las bacterias gram negativas son naturalmente resistentes a la vancomicina porque este antibiótico no logra atravesar su membrana externa (Antonoplis *et al.*, 2019). Algunos ejemplos de los genes intrínsecos en *Acinetobacter*, son OXA-51, abaF, ampC (Poirel *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2017; Mohammad *et al.*, 2013).

1.3.2. Resistencia adquirida.

La resistencia adquirida puede desarrollarse a través de mutaciones o recombinaciones genéticas, o mediante la adquisición de genes que puede realizarse tanto por transferencia génica vertical (VGT) como por transferencia génica horizontal (HGT).

Las mutaciones del ADN (sustituciones, deleciones, etc.) suelen estar causadas por factores de estrés como por ejemplo inanición, radiación UV o productos químicos y pueden transferirse a la descendencia bacteriana (D'Costa *et al.*, 2011; Coculescu *et al.*, 2009)

Por otro lado, la resistencia adquirida por adquisición de material genético se basa en material genético externo al cromosoma, como plásmidos, transposones e integrones, que portan genes involucrados en la resistencia y que pueden transferirse entre bacterias (Jabuk *et al.*, 2017). Los plásmidos, son segmentos de ADN con capacidad de replicarse de forma independiente al ADN cromosómico y suelen ser responsables de portar genes que codifican la producción de enzimas que inactivan los antibióticos (Thomas y Frost, 2014). Las principales vías de transferencia de material genético en las bacterias son la transducción, la transformación, y la conjugación (Fuchsman *et al.*, 2017).

1.4 Mecanismos de resistencia

1.4.1. Disminución de la permeabilidad de la membrana

Este mecanismo ocurre debido a alteraciones en la permeabilidad de las membranas interna y externa, lo que reduce la entrada del fármaco a la célula o acelera su expulsión a través de sistemas de bombeo (Santajit e Indrawattana, 2016). En *A. baumannii*, la disminución de la permeabilidad está asociada a modificaciones estructurales en la membrana externa, como la pérdida o reducción de porinas y alteraciones en la composición de lipopolisacáridos, que limitan la penetración de beta-lactámicos y carbapenémicos (Siroy *et al.*, 2015). Además, mutaciones en porinas específicas similares a la porina OprD en *Pseudomonas aeruginosa*, que induce resistencia a carbapenémicos (Nikaido y Pagés, 2012) han sido documentadas en cepas resistentes de *A. baumannii*, donde la regulación negativa de las proteínas de membrana externa se combina frecuentemente con la sobreexpresión de bombas de eflujo (Yoon *et al.*, 2015).

Esta coordinación entre baja permeabilidad y eflujo activo explica la resistencia multifactorial a quinolonas y aminoglucósidos (Li *et al.*, 2012).

La membrana externa de *A. baumannii* contiene muchas de proteínas de membrana externa (OMP), de las más importantes OmpA, CarO, OMP similares a OprD, Omp 33-36 kDa, AbuO, TolB, DcaP, Oma87/BamA, NmRmpM, CadF, OprF, etc. (Srinivasan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017; Bhamidimarri *et al.*, 2019; Rasooli *et al.*, 2020). Las OMP participan en varias funciones que ayudan a la bacteria a soportar las duras condiciones ambientales y a combatir la amenaza que representan los compuestos antimicrobianos (Srinivasan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). La inmunización con OMP de *A. baumannii* ha reportado un aumento significativo de los parámetros inmunitarios protectores (Alzubaidi y Alkozai, 2015; Bazmara *et al.*, 2019) y los anticuerpos contra las OMP protegen de forma pasiva a los animales de laboratorio (Goel y Kapil, 2001). Los estudios clínicos identifican con frecuencia una expresión diferencial de las OMP en cepas de *A. baumannii* resistentes a los antibióticos, lo que establece su papel en resistencia (Cuenca *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2008; Vashist *et al.*, 2010; Moganty *et al.*, 2011; Mostachio *et al.*, 2012).

La porina sensible a carbapenémicos o CarO se describió por primera vez en cepas de *A. baumannii* sensibles al imipenem (Limansky *et al.*, 2002). La CarO es una proteína de canal de la membrana externa con forma de barril beta de ocho hebras que no tiene un canal continuo (Mussi *et al.*, 2005; Siroy *et al.*, 2005; Zahn *et al.*, 2015), pero que media la entrada de betalactámicos (selectivamente imipenem) en *A. baumannii* (Mussi *et al.*, 2005).

1.4.2. Mutaciones en el sitio blanco

La resistencia a los antibióticos puede surgir a través de mutaciones en el sitio diana del antibiótico, lo que reduce o elimina la capacidad del fármaco para unirse e inhibir su objetivo. Estas mutaciones pueden producirse espontáneamente en los genes bacterianos y luego se seleccionan en presencia del antibiótico (Lambert, 2005). Las modificaciones de los sitios diana de los fármacos que se encuentran en las bacterias gran negativas son un proceso clave por el que se convierten en MDR, siendo un ejemplo

de ello las alteraciones del lípido A. Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas clave que se encuentran en la membrana externa de las bacterias gram negativas, aumentando la estabilidad de las bacterias y protegiéndolas del entorno externo (Anandan y Vrielink, 2020). Otro sitio diana de los fármacos que puede modificarse, dando lugar a resistencia a los antibióticos, es el ARN ribosómico 16S (ARNr) (Doi y Arakawa, 2007).

1.4.3. Sistema de bombas de expulsión

Las bombas activas son responsables de la resistencia más comúnmente observada en el grupo de antibióticos de las tetraciclinas (Breidenstein *et al.*, 2011). A través de un sistema de bombeo activo que requiere energía, las tetraciclinas son expulsadas de la célula, lo que impide su concentración dentro de ella (Li *et al.*, 2019). Las bombas de eflujo son proteínas localizadas en la envoltura o membrana citoplasmática que actúan como sistemas de expulsión, eliminando sustancias perjudiciales para las células desde el interior hacia el exterior celular como colorantes y antibióticos. Estas estructuras están presentes en casi todos los tipos de células, incluyendo bacterias y células eucariotas (Bambeke *et al.*, 2000). Dependiendo de su naturaleza, pueden estar formadas por múltiples subunidades o ser monoméricas. En las bacterias gram negativas, las bombas de eflujo suelen ser complejos tripartitos que abarcan la membrana interna y externa, conectadas a través del periplasma mediante una proteína de fusión de membrana (MFP) (Fernández *et al.*, 2019). En *Acinetobacter spp.* se han encontrado diversos tipos de bombas entre los cuales podemos encontrar a las que se clasifican en: superfamilias facilitadoras principales (MFS), sistemas de resistencia y nodulación (RND), y sistemas de expulsión para múltiples fármacos y compuestos tóxicos (MATE) (Vila y Sánchez - Cespedes, 2007).

1.4.4. Creación de una vía alterna

Otra vía para evitar la acción antimicrobiana es “eludir” la vía metabólica que inhibe el antibiótico mediante la sobreproducción del objetivo del antibiótico. Un ejemplo relevante de este mecanismo es la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) (Eliopoulos y Huovinen, 2001). Consiste en aumentar la producción del objetivo

antimicrobiano con el objetivo de saturar el antibiótico aumentando la cantidad de objetivos disponibles. Uno de los mejores ejemplos de este mecanismo es el desarrollo de resistencia al TMP-SMX. Este fármaco altera la síntesis bacteriana de purinas y algunos aminoácidos importantes al modificar la producción de folato, aprovechando el hecho de que la mayoría de las bacterias son incapaces de incorporar folato de fuentes externas (Munita y Arias, 2016)

1.4.5. Enzimas hidrolizadoras o modificadoras de antibióticos

La mayoría de las bacterias producen enzimas que inhiben los antibióticos, siendo la inactivación enzimática uno de los mecanismos más relevantes de resistencia a estos fármacos (Pérez-Llarena y Bou, 2016). Entre los ejemplos más comunes de este tipo de enzimas, se encuentran las betalactamasas, las cuales pueden ser del tipo serin-betalactamasa, la cuales en algunos casos pueden adquirir actividad carbapenemasa como es el caso las OXAs que pertenecen a la clase D presentes en *A. baumannii*, que hidrolizan antibióticos beta-lactámicos incluyendo a los carbapenémicos (Vila y Martínez, 2018). Otro ejemplo son enzimas modificadoras de antibióticos como las enzimas aminoglucósido-modificantes (AME) que inactivan aminoglucósidos como los acetiles aminoglucósidos transferasas entre otras (Poirel *et al.*, 2020). Además, en microorganismos multirresistentes como *Acinetobacter* también destacan enzimas que modifican macrólidos como esterazas, fosfotransferasas y metilasas, las cuales alteran la estructura de antibióticos como la eritromicina (Sharkey y O'Neill, 2019). Estas enzimas son frecuentemente codificadas en genes acarreados en plásmidos o integrones y que facilitan la diseminación horizontal de la resistencia en entornos clínicos (Southon *et al.*, 2020).

1.5 Resistencia a beta-lactámicos

Uno de los mecanismos más importantes en la resistencia a beta-lactámicos son las beta-lactamasas, las beta-lactamasas constituyen un grupo enzimático bacteriano de gran relevancia clínica debido a su capacidad para hidrolizar el anillo beta-lactámico característico de antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y

carbapenémicos, inactivando así su efecto antimicrobiano (Hamed *et al.*, 2013). Este mecanismo de resistencia, particularmente prevalente en bacterias gram negativas, representa la estrategia de defensa más eficiente contra los antibióticos beta-lactámicos (Bush y Jacoby, 2010). Cabe destacar que los genes que codifican estas enzimas pueden localizarse tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos móviles como plásmidos, lo que facilita su diseminación horizontal entre diferentes especies bacterianas (Palzkill, 2013).

El uso excesivo de carbapenémicos en el ámbito clínico ha ejercido una presión selectiva que ha favorecido la emergencia y propagación de beta-lactamasas con actividad carbapenemasa, generando un grave problema de salud pública (Liang *et al.*, 2021). Estas enzimas no solo han sido detectadas en patógenos hospitalarios, sino que también presentan una amplia distribución en diversos ambientes naturales, lo que sugiere la existencia de un reservorio ambiental de genes de resistencia (Dehbashi *et al.*, 2020). Esta situación es particularmente preocupante para pacientes inmunodeprimidos, quienes enfrentan un mayor riesgo de contraer infecciones por bacterias multirresistentes que limitan significativamente las opciones terapéuticas disponibles.

1.5.1. Enzimas betalactamasas

A nivel molecular, las enzimas betalactamasas se clasifican en cuatro grupos: A, B, C y D (Ambler, 1980). Las clases A, C y D difieren de la clase B, ya que estas actúan como enzimas mediadas por éster, mientras que las de la clase B requieren del ion zinc para funcionar como metaloenzimas (Walkty *et al.*, 2020)

1.5.2. Beta-lactamasas de clase A

Las beta-lactamasas de clase A están presentes en bacterias gram positivas (por ejemplo: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus spp.*) y gram negativas (por ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*), generalmente estas enzimas se diseminan a través de plásmidos o transposones (Walkty *et al.*, 2020). Dentro de este grupo se encuentran las

beta-lactamasas TEM, SHV y CTX-M las cuales son las más comunes y están asociadas principalmente con bacterias gram negativas, siendo betalactamasas de espectro extendido (ESBL) predominante en Enterobacterales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Lomovskaya *et al.*, 2020).

En los últimos años, se ha identificado una nueva familia de ESBL mediadas por plásmidos conocida como ESBL de tipo CTX-M. Estas enzimas representan un linaje distinto dentro de las beta-lactamasas moleculares de clase A y han mostrado una rápida expansión (Rossolini *et al.*, 2008). Principalmente, las ESBL de tipo CTX-M se han detectado en cepas de *Salmonella enterica* serovar, *S. typhimurium*, *A. baumannii* y *E. coli*, aunque también han sido encontradas en otras especies de los Enterobacterales (Bradford, 2001; Nagano *et al.*, 2004). En años recientes, este grupo de ESBL se ha convertido en el predominante en diversas regiones del mundo, como Canadá, Europa, América del Sur, India y algunas áreas de Estados Unidos (Shahid *et al.*, 2011).

1.5.3. Beta-lactamasas de clase C

Las enzimas AmpC pertenecen a la clase C de las beta-lactamasas según la clasificación estructural de Ambler y se clasifican como categoría 1 en el sistema funcional propuesto por Bush (Jacoby, 2009; Bush *et al.*, 1995). Estas enzimas tienen residuos de serina en su sitio catalítico activo, según la clasificación de Ambler (basado en la homología molecular de los aminoácidos). Por lo general, se encuentran en bacterias gram negativas y normalmente están localizadas en el cromosoma (Jacobs *et al.*, 2018). Este tipo de resistencia no es afectado por el ácido clavulánico y algunas presentan una característica inducible, lo que significa que su producción aumenta significativamente en presencia de beta-lactámicos (Meini *et al.*, 2015). Se han descrito beta-lactamasas AmpC, de las que se ha demostrado o se prevé que estén mediadas cromosómicamente, en *Acinetobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon y Jacoby, 2002).

1.5.4. Beta-lactamasas de clase D

Las beta-lactamasas de clase D (DBL), al igual que las enzimas de clase A y C, son serinas beta lactamasas con actividad enzimática basada en su sitio activo, pero se distinguen de estas por su composición de aminoácidos (Ambler, 1980).

Las DBL, también llamadas enzimas OXA u oxacilinasas, son un grupo diverso de más de 400 enzimas genéticamente distintas que se han identificado (Bush, 2013). Principalmente se encuentran en bacterias gram negativas como *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias, aunque también existen en algunos patógenos gram positivos (Walther-Rasmussen y Høiby, 2006; Bush y Fisher, 2011).

1.5.5. Beta-lactamasas de clase B

Las beta-lactamasas de tipo B, constituyen un grupo variado de metaloenzimas capaces de hidrolizar casi todos los antibióticos beta lactámicos, con excepción de los monobactámicos (Aztreonam), y que no son afectadas por los inhibidores de beta lactamasas comercialmente disponibles, como el sulbactam, el tazobactam o el ácido clavulánico (Drawz y Bonomo, 2010). Por el uso de zinc, los quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pueden inhibir su actividad (Drawz y Bonomo, 2010). A partir de la homología de secuencia y la dependencia del ion zinc, se han clasificado en tres subclases: B1, B2 y B3, siendo la subclase B1 la más relevante (Mojica *et al.*, 2016). Las subclases B1 (P.E. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae*) y B3 (P.E. *Stenotrophomonas maltophilia* o *Achromobacter xylosoxidans*) presentan un amplio espectro de hidrólisis de sustratos que incluye penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, mientras que la subclase B2 solo hidroliza carbapenémicos (P.E. *Pseudomonas aeruginosa* o *Serratia fonticola*) (Salahuddin *et al.*, 2018).

Las metalo-betalactamasas han emergido como uno de los mecanismos clave de resistencia a los carbapenémicos, considerados el último recurso terapéutico para tratar infecciones provocadas por cepas con fenotipos multirresistentes (Walsh *et al.*, 2005). Actualmente, estas enzimas se encuentran en diversas especies de bacterias gram

negativas y su presencia suele estar vinculada a la resistencia frente a múltiples tipos de antibióticos, lo que reduce significativamente las opciones de tratamiento (Queenan y Bush, 2007). Las infecciones clínicas causadas por cepas productoras de MBL muestran tasas más elevadas de morbilidad y mortalidad (Deshmukh *et al.*, 2011).

Las metalo-betalactamasas suelen localizarse en elementos genéticos móviles y movilizables, como plásmidos, transposones e integrones, lo que facilita su diseminación entre diferentes bacterias, incluidas Enterobacterales y gram negativos no fermentadores como *Acinetobacter spp.* (Kateete *et al.*, 2016). No obstante, los tipos más importantes están asociados a elementos genéticos móviles como plásmidos, como se ha visto para IMP (Imipenemasa), VIM (Metallo-beta-lactamasa codificada por integrón de Verona) y NDM (Metallo-beta-lactamasa de Nueva Delhi) (Lauretti *et al.*, 1999).

1.5.6. Metallo-beta-lactamasa de Nueva Delhi (NDM)

La metalo-beta-lactamasa de Nueva Delhi (NDM-1), identificada inicialmente en 2009 en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* procedente de un paciente sueco con antecedente de viaje a la India (Yong *et al.*, 2009), representa actualmente uno de los mecanismos de resistencia más críticos en salud pública global. Esta enzima, perteneciente a la clase B de metalo-beta-lactamasas (MBL), ejerce su acción mediante la hidrólisis dependiente de cationes divalentes (Zn^{2+}) del anillo beta-lactámico, inactivando prácticamente todos los antibióticos de esta clase, incluidos los carbapenémicos de último recurso como meropenem, imipenem y ertapenem (Wang *et al.*, 1999).

A diferencia de otras metalobetalactamasas la NDM-1 es única por ser una proteína unida a la membrana. Esta localización celular favorece su secreción y diseminación en vesículas de la membrana externa. También, la NDM-1 es secretada selectivamente en forma activa en las vesículas de la membrana externa por diferentes bacterias, por lo que queda protegida contra la acción de las proteasas extracelulares. (González *et al.*, 2016). Estas vesículas de la membrana externa poseen una potente actividad carbapenemasa que ayuda a titular la cantidad de antibiótico disponible en el lugar de la

infección y puede proteger a las bacterias vecinas que, de otro modo, serían susceptibles a los antibióticos (Rumbo *et al.*, 2011; Chatterjee *et al.*, 2017).

1.6 Transferencia de resistencia en *Acinetobacter spp.*

La resistencia a los antibióticos puede transferirse y adquirirse mediante plásmidos, integrones y transposones.

1.6.1. Transposones

Los transposones (Tns) son elementos de ADN que pueden desplazarse desde la molécula de ADN a otros lugares del mismo ADN o a otras moléculas de ADN (Lambert, 2007).

Los elementos transponibles se dividen en cuatro categorías en las bacterias: secuencia de inserción (IS), Tns compuestos, Tns no compuestos y fago transponible Mu (Streips y Yasbin, 2002; Makalowski *et al.*, 2012). Los elementos móviles (como los transposones de ADN) pueden provocar la propagación de la resistencia a los antibióticos en las especies bacterianas (Malachowa y DeLeo, 2010). Hoy en día, ha quedado claro que las IS pueden causar la resistencia bacteriana a los antibióticos de diferentes maneras (Fowler y Hanson, 2014). La secuencia de inserción puede causar la inactivación de los genes en el sitio de inserción por integración directa y, con los transposones compuestos, causar la transmisión de genes de resistencia a los antibióticos a otras bacterias (Malachowa y DeLeo, 2010).

1.6.2. Integrones

Los integrones son elementos genéticos que contienen un sistema de recombinación específico del sitio capaz de integrar, expresar e intercambiar elementos de ADN específicos, denominados casetes génicos (Hall y Collis, 1995). Se ha informado de que los integrones están muy extendidos y se encuentran en especies clínicas, y su movimiento se ha citado como una de las principales fuentes de preocupación en relación con la resistencia clínica a los antibióticos (Verraes *et al.*, 2013; Partridge *et al.*, 2018).

Dado que los integrones han evolucionado notablemente como marcadores potenciales para identificar la resistencia a los antimicrobianos en los portadores digestivos humanos, se ha informado de que los integrones que codifican genes de resistencia a los antibióticos se encuentran abundantemente en *E. coli* comensal de huéspedes humanos que reciben dosis de antibióticos (Kheiri y Akhtari, 2016).

1.6.3. Plásmidos

Los plásmidos son elementos de ADN que se replican de forma extracromosómica dentro de los genomas bacterianos. Normalmente se transfieren horizontalmente mediante conjugación, pero también pueden hacerlo por transformación, transducción o a través de vesículas extracelulares. Los plásmidos son conocidos por propagar genes implicados en la virulencia (Brouwer *et al.*, 2013) y la interacción ecológica (Hülter *et al.*, 2017), y son el principal mecanismo de propagación de la resistencia a los antimicrobianos. Los plásmidos son ADN extracromosomal portadores de genes de resistencia a antibióticos y también a metales pesados, tienen la capacidad de replicarse por sí mismos mientras que los transposones son secuencias de ADN que pueden moverse a otras posiciones en el genoma bacteriano. Estos elementos son frecuentes en bacterias resistentes además que han sido identificados en aislados clínicos de *Acinetobacter spp.* (Gallego y Towner, 2001).

Por medio de la conjugación genética, los plásmidos pueden pasar de una bacteria a otra con facilidad. Este proceso ocurre comúnmente entre diferentes cepas de *Acinetobacter spp.* debido a su alta adaptabilidad y frecuencia de transformación. La capacidad de ciertas especies para colonizar múltiples ambientes facilita la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos desde especies ambientales hacia los aislados clínicos y viceversa. Por otro lado, la transducción se da a través de numerosos bacteriófagos que tienen un rango de hospedadores más limitado (Rathinavelu *et al.*, 2003).

Ejemplo de la participación de la diseminación de la resistencia mediada por plásmidos tenemos a la rápida diseminación global de *bla*_{NDM-1}, reportado en más de 40 países desde 2010 (incluyendo países de Europa, América, Asia y África), la cual se ve facilitada por su asociación con elementos genéticos móviles versátiles (Rolain *et al.*, 2010).

Estudios moleculares han demostrado su localización en plásmidos conjugativos de tipos IncL/M, IncA/C e IncF, así como su integración en estructuras de integrones asociados al elemento de inserción /SAba125, lo que explica su transferencia horizontal entre diversas especies de Enterobacterales y otros bacilos gram negativos (Palzkill, 2013). La presencia de NDM en plásmidos de *Acinetobacter* ya se ha reportado anteriormente ya sea en origen de comida animal, muestras clínicas, aguas residuales o muestras ambientales (Bing y Dongchang, 2015; Hu *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2013; Zhiyong y Xingzhuo, 2013)

1.7 Mecanismos de resistencia en *A. haemolyticus*

En 2020, Bello-López y colaboradores investigaron cepas de *Acinetobacter* spp. con el objetivo de identificar las especies presentes en pacientes pediátricos y detectar genes de resistencia a los antibióticos. Se recolectaron un total de 54 cepas no duplicadas y no consecutivas de *Acinetobacter* spp. de pacientes pediátricos de las cuales 24 se identificaron como *Acinetobacter haemolyticus*, 24 *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* y una cepa de cada una de las siguientes especies: *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter indicus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter ursingii* y *Acinetobacter venetianus*. Los 24 *A. haemolyticus* se consideraron genéticamente no relacionados, una cepa era resistente a los carbapenémicos, dos a las cefalosporinas, dos a la ciprofloxacina y dieciséis a los aminoglucósidos. Los genes de resistencia a los antibióticos *bla*_{OXA-214} (29 %), *bla*_{OXA-215} (4 %), *bla*_{OXA-264} (8 %), *bla*_{OXA-265} (29 %), *bla*_{NDM-1} (4 %), *aac* (6)-I_g (38 %) y las nuevas variantes *bla*_{OXA-575} (13 %), *bla*_{TEM-229} (75 %), *aac*(6)-I_{ga} (4 %), *aac*(6)-I_{gb} (13 %) y *aac*(6)-I_{gc} (42 %) (Bello-López *et al.*, 2020).

También, Bello-López y colaboradores en 2019 secuenciaron una de las cepas aislada la *A. haemolyticus* AN54 portadora de *bla*_{NDM-1}, y analizaron sus mecanismos de resistencia a los antibióticos y la presencia de seis plásmidos del cual el plásmido pAhaeAN54e contiene *bla*_{NDM-1}. También estudió las características de este nuevo plásmido (pAhaeAN54e), concluyendo que la presencia de este tipo de plásmidos en un patógeno oportunista desempeña un papel importante en la diseminación de genes de

resistencia a antibióticos, especialmente frente a carbapenémicos, en los hospitales mexicanos. La cepa y el plásmido mencionado previamente son con los cuales se trabajaron en este proyecto (Bello-Lopez *et al.*, 2019).

Por otro lado, el conocer si una beta-lactamasa como NDM-1 puede ser inmunogénica tiene varios usos importantes como por ejemplo el desarrollo de vacunas, terapias con anticuerpos o diagnóstico, y en el caso de este trabajo usarla para la producción de anticuerpos para ser utilizados en diferentes trabajos con este microorganismo u otros portadores de esta enzima. La investigación en inmunología actual genera cantidades grandes de datos. Los nuevos avances en áreas como proteómica, genómica y el estudio de patógenos y sus interacciones con los organismos que infectan han creado la necesidad de desarrollar sistemas eficientes para almacenar, organizar y analizar toda esta información. Para responder a este desafío, surge la inmunoinformática, que aplica métodos computacionales para estudiar el funcionamiento del sistema inmunológico. Este campo integra conocimientos de biología, informática, matemáticas y estadística para procesar y analizar datos inmunológicos con mayor precisión (Raoufi *et al.*, 2020).

1.8 Inmunoinformática

La inmunoinformática utiliza herramientas bioinformáticas que incluyen: creación y gestión de bases de datos especializadas, identificación de patrones estructurales y funcionales, y desarrollo de modelos predictivos. La combinación de estos enfoques permite comprender mejor los mecanismos inmunitarios en humanos y animales, incluso frente a patógenos especialmente complejos (Pritam *et al.*, 2019; Hegde *et al.*, 2018; Raeven *et al.*, 2019). La enorme complejidad del sistema inmunitario vertebrado, sumada a la diversidad de patógenos y antígenos ambientales con sus intrincadas vías regulatorias, demanda el manejo de grandes volúmenes de datos. Si bien esta complejidad antes limitaba el progreso en el campo, hoy la vacunología computacional ha revolucionado el diseño de vacunas, haciéndolo más preciso, accesible y específico (Mills *et al.*, 2015; Michalik *et al.*, 2016).

Para entender mejor los procesos complejos relacionados con los patógenos, se han creado modelos computacionales que abordan patógenos de origen viral, bacteriano,

parasitario y fúngico (Qiu *et al.*, 2019; Imle *et al.*, 2019; Miller *et al.*, 2016). Estas herramientas bioinformáticas son particularmente útiles para identificar epítopes prometedores para posible desarrollo de vacunas. Analizan secuencias proteicas buscando patrones específicos que puedan unirse a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que permite diseñar vacunas basadas en epítopes efectivas para poblaciones humanas genéticamente diversas (Fonseca *et al.*, 2017; Utesch *et al.*, 2018).

1.8.1. C-ImmSim

El modelo C-ImmSim es una herramienta computacional que reproduce cómo reacciona el sistema inmunológico de los mamíferos cuando se enfrenta a agentes infecciosos como virus o bacterias, tanto en su respuesta humoral como celular. Para ello, recrea digitalmente una pequeña porción de un órgano linfoide secundario (como un ganglio linfático) utilizando una estructura tridimensional con bordes periódicos, permitiendo incluso modelar múltiples órganos mediante diferentes configuraciones de malla (Bernaschi & Castiglione, 2001; Castiglione & Celada, 2020).

Este modelo pertenece a la categoría de Modelos Basados en Agentes (ABM), lo que significa que las células se representan como agentes individuales que conservan sus propias experiencias durante su ciclo de vida simulado. En el modelo se incluyen las principales células del linaje linfoide, como los linfocitos T helper (TH), los citotóxicos (CTL), los linfocitos B y las células plasmáticas productoras de anticuerpos (PLB), así como algunas células del linaje mieloide, como los macrófagos (MA) y las células dendríticas (DC). Además, C-ImmSim es policlonal, lo que permite simular una gran variedad de linfocitos en lugar de limitarse a una población uniforme de células genéticamente idénticas, que eso es lo que ocurre en los modelos monoclonales (Chiacchio *et al.*, 2014; Palumbo *et al.*, 2023; Mastrostefano *et al.*, 2023).

El modelo representa principalmente una parte de un órgano terciario (P.E. ganglio linfático, amígdala o el bazo) y estos órganos terciarios son lugares donde los antígenos se presentan a las células del sistema inmune. C-ImmSim simula al mismo tiempo tres compartimentos que corresponden a diferentes regiones anatómicas en mamíferos: (1) la médula ósea, donde se producen las células madre hematopoyéticas responsables de

generar nuevas células linfoides y mieloides; (2) el timo, donde se seleccionan las células T vírgenes para evitar que ataquen tejidos propios; y (3) un órgano linfático terciario, como un ganglio linfático. La difusión de las entidades en cada momento simula cómo se propagan físicamente las moléculas en el órgano linfático (Rapin *et al.*, 2010).

1.9 Vectores de clonación

La clonación molecular es una técnica para desarrollar herramientas experimentales basadas en ADN que se utilizan para expresar genes en células de bacterias o de mamíferos. Algunos ejemplos de estas construcciones de ADN incluyen un promotor unido a un gen informador o una secuencia de ADN controlada por un promotor que se encuentra en todas las células. El proceso de clonación molecular requiere varios pasos hay que preparar el vector (que actúa como vehículo) y el fragmento de ADN que se va a insertar, unir la inserción al vector, transformar las células competentes de *E. coli* e identificar las clonas positivas (Mahmoud *et al.*, 2021; Shahinaz *et al.*, 2021).

Los vectores que se usan en laboratorios son versiones más pequeñas de los plásmidos naturales y tienen varias características como un origen de replicación, un gen que confiere resistencia a fármacos y sitios de restricción únicos que ayudan a insertar fragmentos de ADN. Muchas veces, varios sitios de restricción se agrupan en lo que se conoce como regiones polilinker, lo que facilita elegir combinaciones de enzimas de restricción que sean convenientes dependiendo el fragmento de ADN que queramos insertar (Nora *et al.*, 2019). Elegir las enzimas de restricción correctas es clave para diseñar una estrategia de clonación ya que algunas dejan unos extremos sobresalientes de unas pocas bases en el punto de corte, estos extremos se emparejan fácilmente, lo que mejora la eficacia de la ligadura y aumenta las probabilidades de éxito en la clonación (Dusek *et al.*, 2020).

La clonación mediante PCR es una herramienta que se ocupa mucho en ingeniería genética gracias a su gran versatilidad, una de sus principales ventajas es que permite trabajar con cantidades pequeñas de material genético, facilitando la inserción de fragmentos de ADN en vectores incluso cuando solo se tienen pequeñas muestras (Bertero *et al.*, 2017). En este proceso, el fragmento de ADN que se amplificó mediante

una PCR se une directamente al vector. Entre los distintos métodos disponibles, la clonación TA destaca por su simplicidad y eficiencia, sin embargo, requiere un diseño cuidadoso de los oligonucleótidos y ajustar bien las condiciones de la reacción de PCR. Durante la amplificación, la Taq polimerasa añade una molécula de adenosina en los extremos 3', estos sitios con Adenosina pueden unirse fácilmente a vectores con cola Timina, de ahí el nombre de clonación TA (Zhou y Gomez-Sánchez, 2000).

Los vectores de clonación son herramientas fundamentales en la biología actual, actuando como vehículos moleculares que permiten la inserción, replicación y expresión de genes (Rosano y Ceccarelli, 2020). Gracias a estos sistemas, es posible diseñar microorganismos para producir proteínas recombinantes con diversas aplicaciones como médicas, industriales, agriculturas, entre otras. Sin los avances en vectores de clonación (como los plásmidos pET o sistemas basados en CRISPR-Cas9), la producción masiva de estas proteínas resultaría difícil que pasara (Terpe, 2020; Adli, 2023). Una proteína codificada en ADN recombinante y expresada en un huésped heterólogo es una proteína recombinante (Young *et al.*, 2012). En 1973, Herbert Boyer y Stanley Cohen fueron los primeros en el uso del ADN recombinante en procesos de clonación y expresión génica. En esa década el uso de la expresión de ADN recombinante para la producción de proteínas recombinantes se desarrolló mucho y hoy en día la producción de proteínas recombinantes se ha utilizado mucho. De hecho, las vacunas contra el COVID-19 son un buen ejemplo del uso de esta tecnología (Francis *et al.*, 2022; Ghiasi *et al.*, 2021) y esta tecnología de ADN recombinante podría ser ocupada como terapia para tratamientos, por ejemplo, contra el cáncer y otras enfermedades que hoy resultan incurables (Souriau y Hudson, 2003) (Kelliny *et al.*, 2021).

En el presente trabajo describimos las propiedades inmunológicas de la proteína NDM-1 *In silico*, para saber si puede ser administrada en un biomodelo. Por otro lado, con base a los resultados obtener el vector de clonación pCR2.1-TOPO::ndm-1, que posteriormente se utilizara para la construcción de un vector de expresión, el cual se utilizara en un futuro para expresar, purificar la proteína y administrarla en un biomodelo para obtener anticuerpos.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad *Acinetobacter haemolyticus* se ha comenzado a asociar a infecciones nosocomiales debido a la creciente adquisición de genes de resistencia a los antibióticos. La resistencia adquirida se obtiene a través de la transferencia horizontal de genes, siendo *bla*_{NDM-1} uno de los principales adquiridos por muchas especies del género *Acinetobacter*. Debido a su importancia de la proteína NDM-1 en la resistencia, es necesario conocer su capacidad inmunogénica y obtener anticuerpos policlonales que nos permita determinar la presencia de esta proteína en aislados clínicos, microvesículas secretadas por *Acinetobacter spp.* Así como poder ocupar en un futuro los anticuerpos para estudios de detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas o para el desarrollo de vacunas.

3. HIPOTESIS

- Mediante herramientas bioinformáticas *in silico*, se predice que la proteína NDM-1 presenta capacidad inmunogénica. Por lo que la proteína recombinante podría servir como antígeno para la generación de anticuerpos policlonales en biomodelos animales.
- Es posible clonar *bla*_{NDM-1}, responsable de la resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter haemolyticus*, en el vector pCR2.1-TOPO mediante técnicas de PCR y clonación, generando una construcción estable en *E. coli*.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Identificar y evaluar las características inmunogénicas de la proteína NDM - 1 *in silico* y generar un vector de clonación de la proteína NDM-1 de *Acinetobacter haemolyticus* AN54.

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar *in silico* los epitopes de activación de linfocitos B y T de la proteína NDM.
2. Identificar *in silico* las predicciones de antigenicidad, alergenicidad y toxicidad de la proteína NDM-1.
3. Identificar *in silico* la respuesta inmune humoral y celular activadas por la proteína NDM-1.
4. Realizar el modelado *in silico* de la proteína NDM-1
5. Realizar la construcción del vector de mantenimiento pCR2.1-TOPO ::*bla*_{NDM-1}

5 METODOLOGÍA

5.1 Diseño experimental

En la Figura 1 se presenta el esquema de trabajo que se llevó a cabo en este trabajo de investigación.

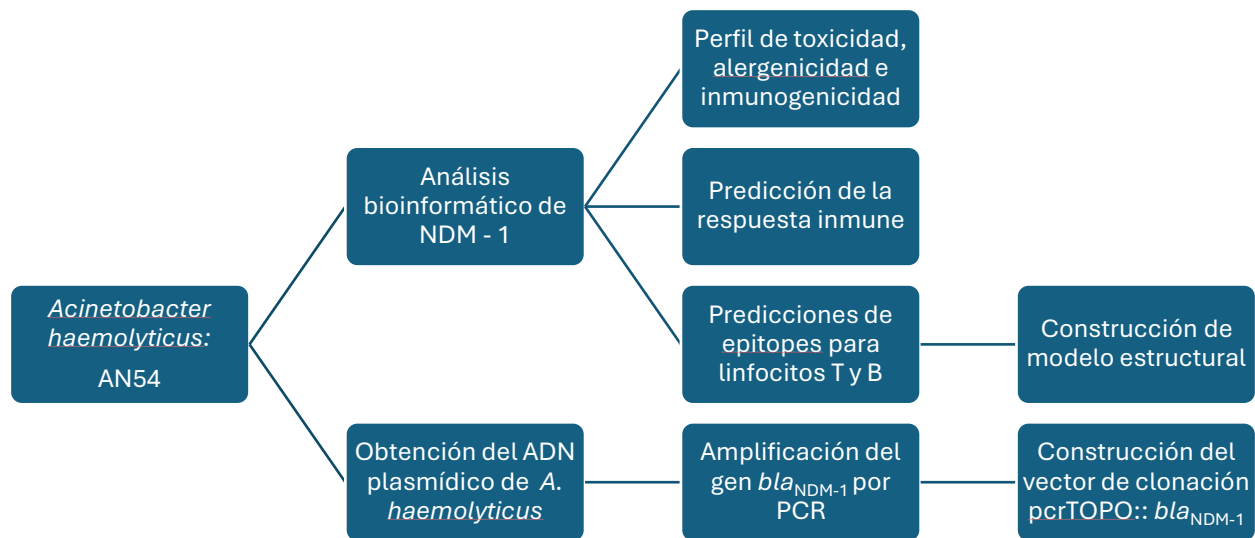


Figura 1. Esquema general de trabajo.

5.2 Cepas de estudio

Se trabajó con la cepa de *A. haemolyticus* AN54 portadora de *bla*_{NDM-1}, la cual fue aislada de un paciente del Hospital Para El Niño Poblano (HNP), previamente estudiada por (Bello *et al.*, 2020), la cual fue almacenada a -70°C.

5.3 Técnicas y procedimientos

5.3.1. Identificación de epítopes de la proteína NDM-1 y Modelado.

A partir de la secuencia de la proteína NDM- 1 obtenida de la base de datos GenBank (Genbank: KP772181.1), se buscaron los posibles epítopes para linfocitos B y T. Para determinar los epítopes que reconocen a linfocitos B se utilizó la plataforma BepiPred 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/>) y para determinar los epítopes que reconocerán a linfocitos T se utilizó la plataforma NetCTL 1.2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetCTL-1.2/>). Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) fue la plataforma que se usó para el modelado de la proteína y el software Pymol (<https://www.pymol.org/>) para visualizar los epitopes encontrados en la estructura terciaria de la proteína resaltando los epítopes para linfocitos T y B.

5.3.2 Predicciones de la toxicidad e inmunogenicidad de los epítopes

La inmunogenicidad de los epítopes predichos se analizó mediante el servidor de inmunogenicidad de clase I IEDB (<http://tools.immuneepitope.Org/immunogenicity/>). Y ToxinPred se utilizó para confirmar la no toxicidad de los epítopes (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>).

5.3.3. Predicciones de Antigenicidad, Alergenicidad, Toxicidad y Propiedades inmunogénicas de la proteína NDM-1

Se utilizó la plataforma Vaxijen 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) para obtener las predicciones de antígenos protectores, para la predicción de alergenidad se utilizó AllerTOP 2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) y para toxicidad se utilizó ToxinPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/design.php>). Además, se utilizó la plataforma C-ImmSimm (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/index.php>) para determinar la viabilidad de las proteínas como inmunógenos para su desarrollo como biosensor.

5.3.4 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de *bla*_{NDM-1}

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación del *bla*_{NDM-1} se diseñaron buscando las variantes de NDM más comunes en México, encontrando que son NDM-1, 2 y 3. Se hizo un alineamiento en el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) para poder observar la similitud de las secuencias, después se ocuparon los programas NEBCutter 2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/?noredir>) y Bioinformatics (https://www.bioinformatics.org/sms2/rest_map.html) para hacer los mapas de restricción de los genes de las proteínas y posteriormente seleccionar los sitios de restricción con base al sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pCR2.1-TOPO y adicionarlos en los oligonucleótidos diseñados.

5.3.5. Obtención ADN plasmídico conteniendo el plásmido pAhaeAN54e portador de *bla*_{NDM-1} de la cepa *A. haemolyticus* AN54

La purificación del ADN plasmídico se realizó a través de lisis alcalina, la cual se basa en la diferencia en las condiciones de desnaturalización del ADN cromosómico y plasmídico, lo que permite separarlos. Las bacterias se lisan, durante este paso, tanto el ADN cromosómico como el plasmídico se desnaturalizan. La neutralización posterior con acetato de potasio permite que sólo el ADN plasmídico cerrado covalentemente vuelva a unirse y permanezca solubilizado. La técnica ocupada fue la reportada por Bello López en 2019 (Bello-López, 2019)

Se colocó una colonia en 1 mL de PBS en un tubo ependorf, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos y se repitió este paso. A continuación, se decantó el sobrenadante, y se añadió 1 mL de solución salina, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 5 minutos y se repitió el proceso. Después, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 mL de EDTA, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos y se repitió el procedimiento.

Una vez completados estos pasos, se adicionaron 400 µL de Solución 1 (30 mL de sacarosa 0.3M, 25 mL de EDTA 25 mM ajustado a un pH de 8, 25 mL de Tris-HCL 25mM ajustado a un pH de 8 y 31.25 mL de agua) a cada tubo y se resuspendió la pastilla

mediante un vortex. Luego, se añadieron 100 µL de lisozima a cada tubo y se mezcló suavemente. Se incubó la mezcla a 4°C durante 30 minutos. Después de la incubación, se adicionaron 250 µL de Solución 2 (300 µL de NaOH 5M, 1000 µL de SDS al 10% y 3.7 mL de agua), se mezcló y se procedió a incubar a 55°C durante 30 minutos. Al finalizar la incubación, se enfrió la mezcla y se agregaron 80 µL de fenol-cloroformo. Se resuspendió la pastilla mediante un vortex hasta obtener una solución uniforme. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos y desechó el sobrenadante, quedándose únicamente con la pastilla. Se continuó añadiendo 100 µL de etanol absoluto al 100% e incubó durante 2 minutos a -20°C.

Finalmente, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Como último paso, se resuspendió la pastilla en 20 µL de agua inyectable.

5.3.6. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de las bandas plasmídicas, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 0.7 %, los cuales se corrieron a 90V por 45 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Rules 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific). Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (0.5 g/L) por 5 segundos y lavados en agua destilada por 25 minutos. Los geles se fotografiaron en el foto documentador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

5.3.7. Amplificación del gen *bla*_{N_{DM}-1} por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo la amplificación de *bla*_{N_{DM}-1} a partir del ADN plasmídico mediante PCR en un termociclador T Professional TRIO Thermocycler (Biometra) con un volumen final de 10 µL por reacción y cuyos componentes se muestran en la Tabla 1. Se ocupó 1 µL del ADN plasmídico obtenido de la obtención ADN plasmídico de *A. haemolyticus* como templado para hacer la reacción PCR. Como control negativo se ocupó la mezcla de la reacción de PCR sin el ADN templado.

Tabla 1. Componentes y concentraciones para la PCR

<i>Componentes</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Condiciones para PCR (volumen por tubo en μL)</i>	<i>Concentración final</i>
<i>DNA Polymerase</i>	5 U/ μL	0.1	0.5 U/ μL
<i>Oligonucleótido Forward</i>	25 μM	0.3	0.75 μM
<i>Oligonucleótido Reverse</i>	25 μM	0.3	0.75 μM
<i>Agua libre de nucleasas</i>	-	5.9	-
<i>DNA plasmídico</i>	-	1.0	-
<i>dNTPs</i>	10 μM	0.4	0.4 mM
<i>Buffer</i>	10x	1.0	1x
<i>MgCl₂</i>	25 mM	1.0	2.5 mM
<i>Volumen final</i>		10	

Las condiciones para la PCR utilizadas fueron de 94°C por 1 minuto, 67°C por 1 minuto y 72°C durante 1 minuto por 30 ciclos. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen fueron los previamente diseñados y en cada reacción de PCR se colocó un control negativo, el control negativo consistió en la misma mezcla de reacción, pero en lugar de ADN se colocó el correspondiente volumen de agua inyectable estéril.

Los productos de PCR se visualizaron tras realizar electroforesis en geles de agarosa al 1% 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.

5.3.8. Purificación de banda de amplificado del gen *bla*_{NDM-1} en gel de electroforesis

Para la purificación del gen amplificado por PCR se ocupó el kit Zymoclean Gel DNA Recovery kit de la empresa Zymo Research, para el uso de dicho kit se siguió el protocolo del fabricante, el cual es el siguiente:

El fragmento de ADN fue cortado del gel de agarosa utilizando un bisturí o un cubreobjetos y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, se adicionaron tres volúmenes de solución ADB por cada volumen de agarosa cortado del gel, seguido de una incubación a 55°C durante 10 minutos o hasta que el gel se disolvió completamente. La solución de agarosa derretida se transfirió a una columna Zymo-Spin colocada en un tubo de colección y se centrifugó durante 1 minuto, eliminando el sobrenadante. A continuación, se agregaron 200 µL de ADN *Wash Buffer* a la columna y se centrifugó durante 30 segundos; este paso de lavado se repitió una vez más, descartando nuevamente el sobrenadante. Finalmente, se adicionaron 20 µL de agua directamente sobre la matriz de la columna, se colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 mL y se centrifugó durante 1 minuto para eluir el ADN purificado.

5.3.9. Reacción de ligación de pCR2.1-TOPO y el gen *bla*_{NDM-1}

El gen *bla*_{NDM-1} se clonó en el vector de clonación pCR2.1-TOPO. Este vector tiene extremos de timidina 3' para clonación TA y Topoisomerasa I unida covalentemente al vector, por lo que no se requiere cortar previamente con las enzimas de restricción. Se utilizó el gen purificado de banda de amplificado de electroforesis (5.3.8) que ya tenía los sitios de restricción elegidos. Una vez ya obtenida la reacción, se mezcló gentilmente e incubó por 30 minutos a 22 – 23°C (Figura 2). La tabla 2 describe cómo se realizó la reacción de clonación TOPO:

Tabla 2. Componentes y volúmenes para la reacción de clonación con pCR2.1-TOPO

Reactivos	Volumen
Producto fresco de PCR (gen <i>bla_NDM-1</i>)	0.5 – 4 μ L
Solución salina	1 μ L
Agua	Añadir a volumen total de 5 μ L
Vector pCR2.1-TOPO	1 μ L
Volumen final	6 μ L

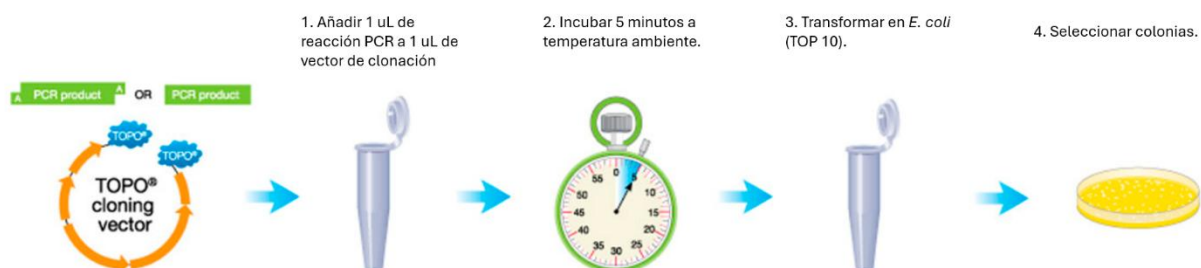


Figura 2. Protocolo de clonación TOPO®. Modificado de Patel, 2009

5.3.10. Células competentes *E. coli* Top 10

Las células competentes son células bacterianas capaces de captar ADN exógeno de su entorno, para este trabajo, se utilizaron para incorporarle el vector pCR2.1-TOPO:: *bla_NDM-1* y poder evaluar el vector construido. Para la preparación de las células competentes se hizo crecer una colonia toda la noche a 37°C en agitación en 5 mL de LB o BHI (preinóculo). Posteriormente, se adicionó el preinóculo a un matraz de 50 mL de LB o BHI y se dejó crecer a 37°C con agitación. Se midió la Densidad Óptica hasta

que el cultivo alcanzó una DO600 = 0.6. Luego, el matraz se colocó sobre hielo durante 30 minutos. Después, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 25 mL de CaCl₂ 200 mM, se resuspendió la muestra y se dejó en hielo durante 1 hora. A continuación, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se mezclaron 4 mL de CaCl₂ con 1 mL de glicerol. Finalmente, se añadieron 500 µL de esta mezcla a cada tubo, se resuspendió el contenido y se almacenó a -70°C.

5.3.11. Transformación de *Escherichia coli* Top 10 con pCR2.1-TOPO :: *bla*_{NDM-1}.

Posteriormente, se realizó una transformación, de la construcción en células competentes de *E. coli* (TOP 10). Para la técnica de transformación, se tomó un vial de células competentes y se adicionó el volumen de la ligación, dejándolo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 10 minutos y se añadió 1 mL de medio BHI. Luego, se incubó nuevamente a 37°C durante 1 hora. Después, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el medio y se sembraron las células mediante un cultivo masivo en una placa de TSA o BHI con X-gal para la selección de colonias, y ampicilina y kanamicina, ya que estos son los antibióticos de selección del plásmido de clonación, lo que permitió seleccionar las colonias transformantes. Finalmente, se dejó incubar a 37°C toda la noche y posteriormente se recuperaron las colonias transconjugantes.

5.3.12. Comprobación de la presencia de la construcción en colonias transformantes

Después de la incubación, se observó el crecimiento de colonias blancas candidatas a portar el plásmido; se seleccionaron y aislaron colonias las cuales fueron sembradas en medio BHI líquido e incubadas a 37°C en agitación por 8 horas, posteriormente se realizó la extracción de plásmido por lisis alcalina, el ADN plasmídico obtenido fue separado electroforéticamente en gel de agarosa.

5.3.13. Digestión de ADN plasmídico obtenido de las colonias transconjugantes con enzimas de restricción

Posteriormente se realizó una digestión con enzimas de restricción. La reacción de restricción de ADN plasmídico se llevó a cabo con las enzimas XhoI y KpnI, utilizando primero KpnI y posteriormente XhoI. En la primera digestión se ocuparon 20.0 uL de ADN, 5.0 µL de Buffer de la enzima, 0.2 µL de KpnI y 25.0 uL de agua, teniendo un volumen final de 50.0 µL que se incubaron a 37 °C por una hora. Después se purificó la digestión con el kit de purificación de ADN plasmídico. Para la segunda digestión, se ocuparon 20.0 µL del plásmido linealizado previamente, 5.0 µL de Buffer R, 0.2 uL de XhoI y 25.0 µL de agua, los cuales también se pusieron a incubar por 1 hora a 37°C. Finalmente la visualización de la digestión total del ADN fue mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6 Resultados.

6.1 Propiedades Inmunogénicas *In silico* de la proteína NDM - 1

Se realizaron predicciones en la plataforma BepiPred para determinar los posibles epítopes para linfocitos B. Se encontraron 7 posibles regiones con alta probabilidad de ser reconocidos por anticuerpos, estos epítopes van de los 4 a los 17 aminoácidos de longitud (Tabla 3). Una vez obtenidos los posibles epítopes, se recurrió al programa Pymol para visualizar la posición dentro de la estructura de la proteína de los posibles epítopes encontrados, dichas regiones se muestran en la (Figura 3), donde podemos ver que todos los epítopes para linfocitos B (rojo) están expuestos en la estructura de la proteína.

Tabla 3. Predicciones de epítopes para linfocitos B de la proteína NDM–1

Epítopes para linfocitos B	Número de aminoácidos
NIMH	4
RPTIGQQMETGDQRFGD	17
DMPGFG	6
PQEGM	5
AANGWVE	7
LGNLGDADTEHY	12
PDSRAAIT	8

Predicción *in silico* de epítopes para linfocitos B en la proteína NDM–1 con la plataforma BepiPred. Alanina (A), Arginina (R), Asparagina (N), Ácido aspártico o Aspartato (D), Cisteína (C), Glutamina (Q), Ácido glutámico o Glutamato (E), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Leucina (L), Lisina (K), Metionina (M), Fenilalanina (F), Prolina (P), Serina (S), Treonina (T), Triptófano (W), Tirosina (Y), Valina (V).

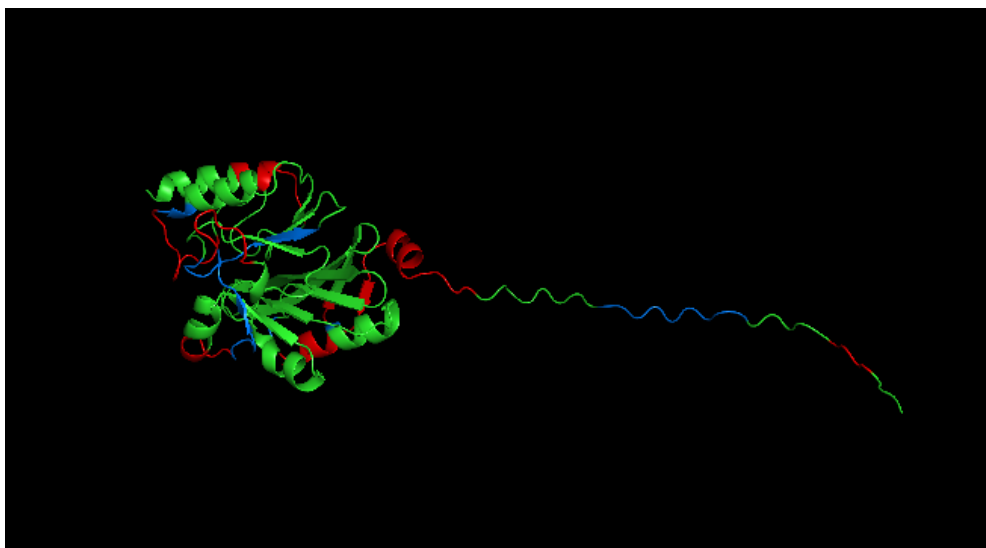


Figura. 3. Probables epítopes para Linfocitos B y T en la estructura terciaria de la proteína NDM-1. Se muestra el modelaje de la proteína NDM-1 con el programa Pymol, resaltando los cuatro epítopes para células T (azul) y siete para células B (rojo).

Por otro lado, se realizaron las predicciones para determinar los posibles epítopes para linfocitos T en la plataforma NetCTL 1.2. Encontrando 4 posibles epítopes con una longitud de 9 aminoácidos (Tabla 4) y al realizar la posible posición de estos en la proteína se encontraron que solo tres de los cuatro epítopes para linfocitos T (azul) se encuentran expuestos (Figura 3).

Tabla 4. Predicciones de epítopes para linfocitos T de la proteína NDM – 1 *in silico*

Epítopes para linfocitos T	Número de aminoácidos
STALAAALM	9
WTDDQTAQI	9
VAAQHSLTF	9
TSDNITVGI	9

Predicción *in silico* de epítopes para linfocitos T en la proteína NDM–1 con la plataforma NetCTL 1.2. Alanina (A), Arginina (R), Asparagina (N), Ácido aspártico o Aspartato (D), Cisteína (C), Glutamina (Q), Ácido glutámico o Glutamato (E), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Leucina (L), Lisina (K), Metionina (M), Fenilalanina (F), Prolina (P), Serina (S), Treonina (T), Triptófano (W), Tirosina (Y), Valina (V).

6.2 Resultados *in silico* de la toxicidad y predicción de la inmunogenicidad de los epítopes

Los epítopes predichos presentados en las Tablas 3 y 4 se evaluaron mediante la predicción de inmunogenicidad IEDB. Las puntuaciones de inmunogenicidad de los epítoposepítopes para linfocitos B oscilaron entre 0.28656 y -0.057 y para los linfocitos T oscilaron entre 0.22147 y -0.21477. Se seleccionaron los epítopes que obtuvieron un valor positivo. Los resultados para la inmunogenicidad se muestran en la Tabla 5 y Tabla 6. Los resultados para la toxicidad se muestran en las Tabla 7 y Tabla 8.

Tabla 5. Puntuaje de inmunogenicidad para los epítopes predichos para linfocitos B de NDM – 1

Péptido	Longitud	Puntaje
AANGWVE	7	0.28656
LGNLGDADTEHY	12	0.24098
PDSRAAIT	8	0.18563
DMPGFG	6	0.1445
PQEGM	5	0.0666
RPTIGQQMETGDQRFGD	17	0.02734
NIMH	4	-0.057

Tabla 6. Puntuaje de inmunogenicidad para los epítopes predichos para linfocitos T de NDM–1

Péptido	Longitud	Puntaje
TSDNITVGI	9	0.22147
STALAAALM	9	0.10301
WTDDQTAQI	9	0.0814
VAAQHSLTF	9	0.21477

Los resultados de toxicidad mostraron que todos los epítopes predichos tanto para linfocitos B como para linfocito T son no tóxicos (tablas 7 y 8).

Tabla 7. Predicciones de toxicidad para los epítopes predichos para linfocitos T de NDM-1

Epítopes para linfocitos B	Número de aminoácidos	Resultado
NIMH	4	No tóxico
RPTIGQQMETGDQRFGD	17	No tóxico
DMPGFG	6	No tóxico
PQEGM	5	No tóxico
AANGWVE	7	No tóxico
LGNLGDADTEHY	12	No tóxico
PDSRAAIT	8	No tóxico

Tabla 8. Predicciones de toxicidad para los epítopes predichos para linfocitos B de NDM-1

Epítopes para linfocitos T	Número de aminoácidos	Resultado
STALAAALM	9	No tóxico
WTDDQTAQI	9	No tóxico
VAAQHSLTF	9	No tóxico
TSDNITVGI	9	No tóxico

6.3 Antigenicidad, alergenicidad y toxicidad *In silico* de la proteína NDM-1

Para determinar la alergenicidad de la proteína, se utilizó el servidor AllerTOP 2.0; para determinar la toxicidad se utilizó ToxinPred 2.0; y para su antigenicidad como probable uso como vacuna se utilizó Vaxign y se utilizó C-ImmSim para poder determinar la posible inmunogenicidad de la proteína NDM-1. En la tabla 9 podemos ver las plataformas

utilizadas, las propiedades evaluadas y su respectivo resultado obtenido, los cuales muestran que se puede reconocer como antígeno, no alergeno y no tóxico.

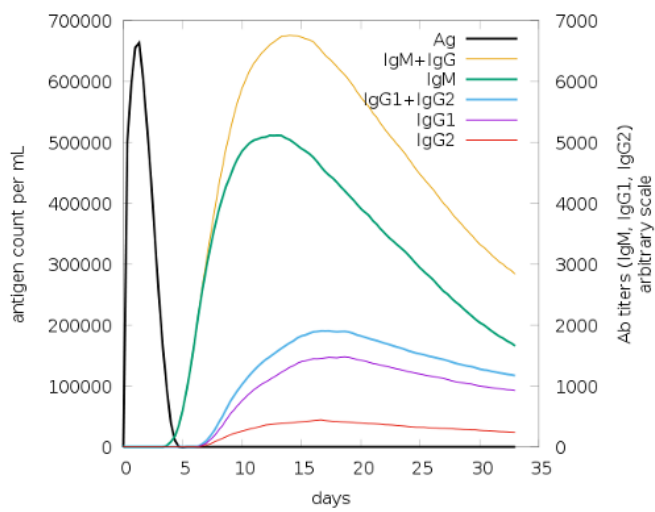
Tabla 9. Tabla de propiedades tóxicas, alergénicas y antigénicas evaluadas para NDM-1

Plataforma	Propiedades	NDM-1
Vaxijen 2.0	Antigenicidad protectora	Antígeno
	Puntuación	0.4127
		Umbral / Límite
		0.4
Aller TOP 2.0	Alergenicidad	No alergeno
ToxinPred 2.0	Toxicidad	No tóxico
	ML-Puntuación	0.2

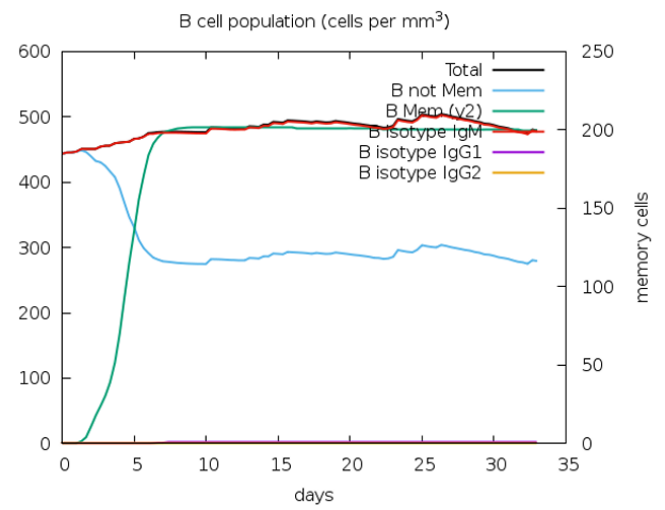
6.4. C – ImmSim

En la Figura 4 podemos observar los gráficos del comportamiento del sistema inmune, tras la inmunización con la proteína NDM-1, la cual nos permitió determinar *in silico* que esta proteína es inmunogénica debido al perfil de inmunoglobulinas y de citocinas posiblemente generados. En el panel A podemos observar el posible perfil de Inmunoglobulinas generado después de la inmunización, observando una alta y rápida respuesta de IgM, así como una respuesta un poco más tardada de IgG. En el panel B se ve la población de células B, destacando la alta producción de linfocitos B de memoria. Para el panel C podemos observar la generación de células T-Helper, donde vemos la activación de células TH tanto en estado activo, como en estado de reposo. En el panel D se observa la generación de células T citotóxicas tras la inmunización, en este panel podemos observar, así como en el anterior, vemos la activación de células TC tanto en estado activo, como en estado de reposo. Por último, en el panel E tenemos el perfil de citocinas en donde destacan la estimulación de interferón gamma y la interleucina 2.

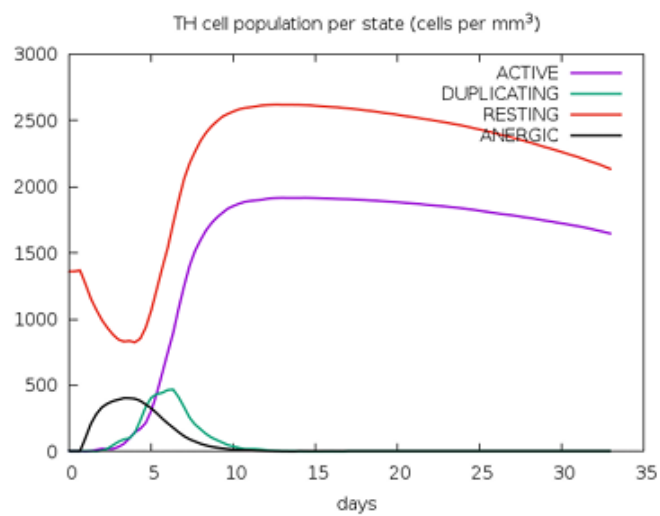
A



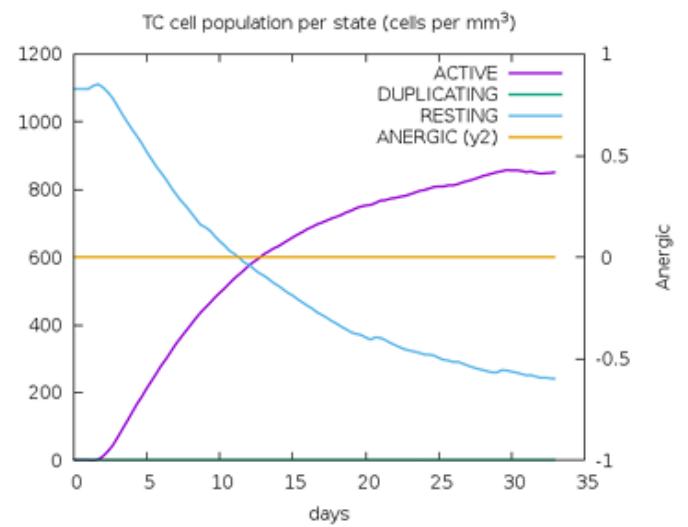
B



C



D



E

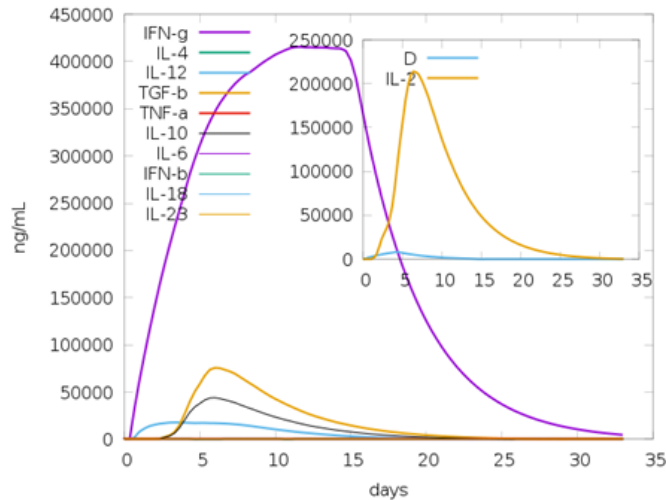


Figura 4. Resultados de la simulación inmunológica mediante C-ImmSim. A) La producción de inmunoglobulinas representa la proliferación de la respuesta inmunitaria tras la administración de la inmunización. **B)** La población activa de células B se observa con la administración de la inmunización. **C)** Generación de células T-Helper. **D)** Se observa la generación de células T citotóxicas tras la inmunización. El “Resting” indica a las células, que no se mostraron a los antígenos mientras que “Anergic” indica el nivel de tolerancia del antígeno. **E)** El perfil de citocinas muestra el nivel IFN-g inducido tras la administración de la inmunización

6.5 Diseño de oligonucleótidos con sitios de restricción

Como parte de la estrategia experimental para la clonación de *bla*_{NDM-1} de *Acinetobacter haemolyticus* AN54, se diseñaron oligonucleótidos específicos que incluyeron sitios de restricción en sus extremos 5'. Estos sitios permiten la posterior inserción del gen en el vector de mantenimiento seleccionado. Por lo que se realizó el mapeo de sitios de restricción del gen *bla*_{NDM-1}. (Figura 5)

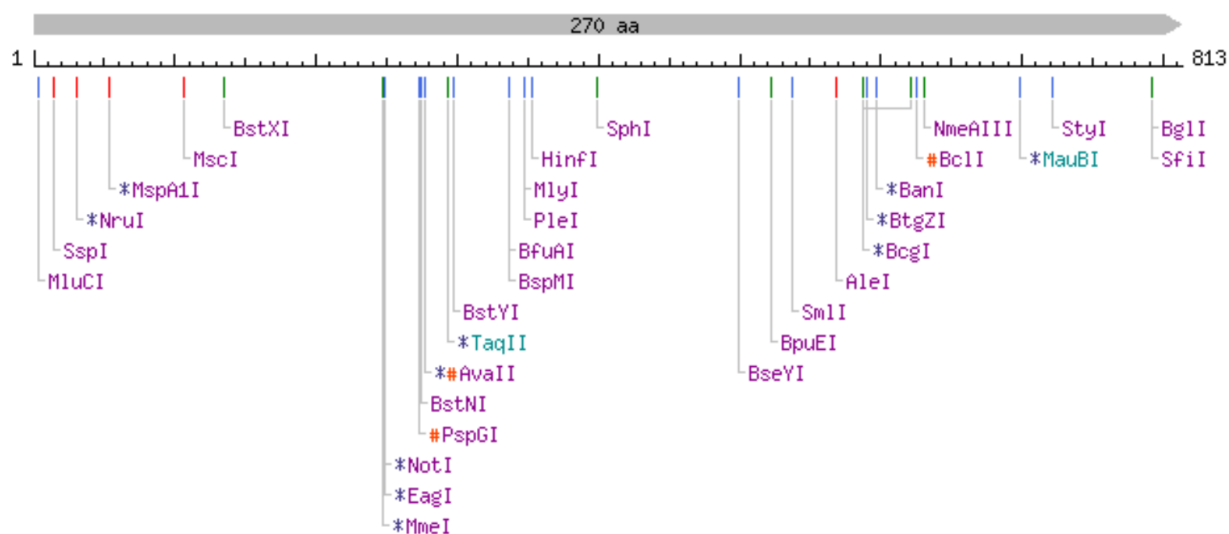


Figura 5. Mapa de restricción de *bla*_{NDM-1}. Determinación de la presencia de los sitios de restricción en el gen *bla*_{NDM-1} utilizando el programa NEBcutter V2.0 con el fin de poder determinar las enzimas de restricción a utilizar en los oligonucleótidos.

Con los resultados del mapa de restricción y conociendo el sitio de multiclonación del vector, se añadió XhoI al oligonucleótido forward y KpnI para el oligonucleótido reverse. Obteniendo los oligonucleótidos que posteriormente se ocuparon. La parte en negritas es el nombre que recibió el oligonucleótido, la parte en rojo es el sitio de restricción añadido y la parte en negro es la secuencia del gen.

NDMprotF: CTCGAGATGGAATTGCCCAATATTAT

NDMprotR: GGTACCGCGCAGCTTGTCGGCCAT

6.6 Extracción del ADN plasmídico de la cepa *A. haemolyticus* AN54

Con la finalidad de obtener el plásmido pAhaeAN54e de *A. haemolyticus* portador del gen *bla*_{NDM-1}, se realizó la extracción de ADN plasmídico de la cepa AN54 por la técnica de lisis alcalina. La Figura 6 muestra el patrón de banda plasmídico de la cepa generada por los cinco plásmidos que alberga la cepa AN54, incluyendo el plásmido pAhaeAN54e portador de *bla*_{NDM-1}, con un peso de 45.46 kbp.

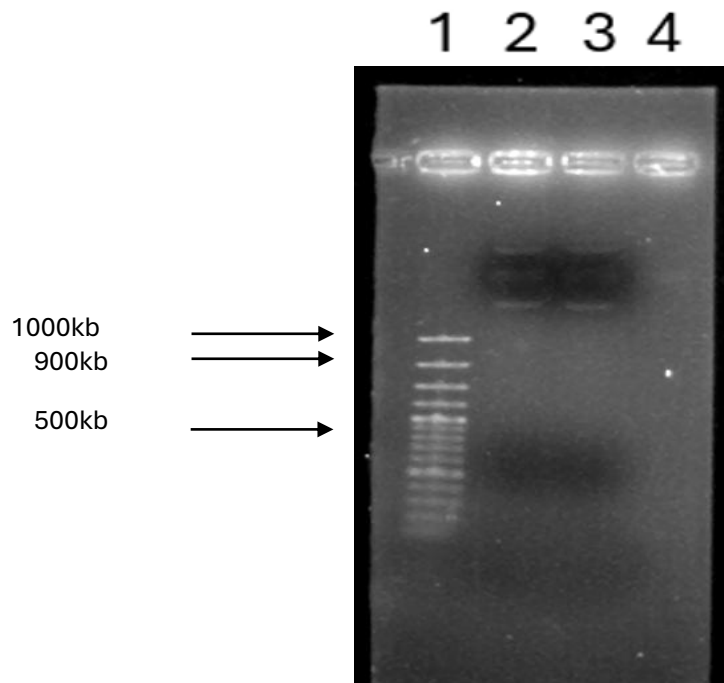


Figura 6. Corrimiento en gel de agarosa al 1% de la extracción de plásmidos por Lisis Alcalina en *A. haemolyticus* AN54. Carril 1 Marcador de Peso Molecular, **carril 2 y 3** extracción de plásmidos de cepa AN54, **carril 4** vacío.

6.7 Amplificación de *bla*_{NDM-1} a partir de la purificación plasmídica de la cepa *A. haemolyticus* AN54

Se realizaron reacciones de PCR para detectar *bla*_{NDM-1} en el producto de la extracción de plásmidos de *A. haemolyticus*. La flecha que se muestra en la Figura 7 muestra el amplificado de 813 kb para *bla*_{NDM-1}. Se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 %.

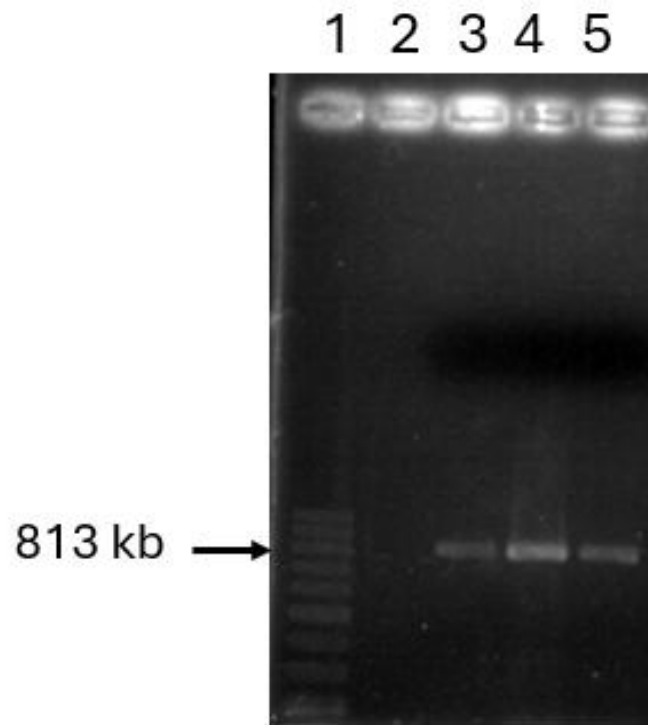


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *bla*_{NDM-1} en *A. haemolyticus*. Carril 1 Marcador de Peso Molecular, **carril 2** control negativo, **carril 3, 4 y 5** amplificado de *bla*_{NDM-1} albergado en el plásmido pAhaeAN54e de la cepa AN54.

6.8 Clonación y transformación

El producto de PCR de *bla*_{NDM-1} se clonó en el vector pCR2.1-TOPO, posteriormente, se transformó en *E. coli* TOP 10 y se sembró en placas LB/kanamicina-ampicilina. Fueron 34 colonias que crecieron en las placas por ser resistentes a ampicilina y kanamicina

(figura 8). Estas son las que posiblemente contenían el plásmido con pCR2.1-TOPO::ndm1 (colonias blancas), para confirmar esto, se evaluaron 4 colonias aleatorias mediante PCR de colonia (Figura 9).

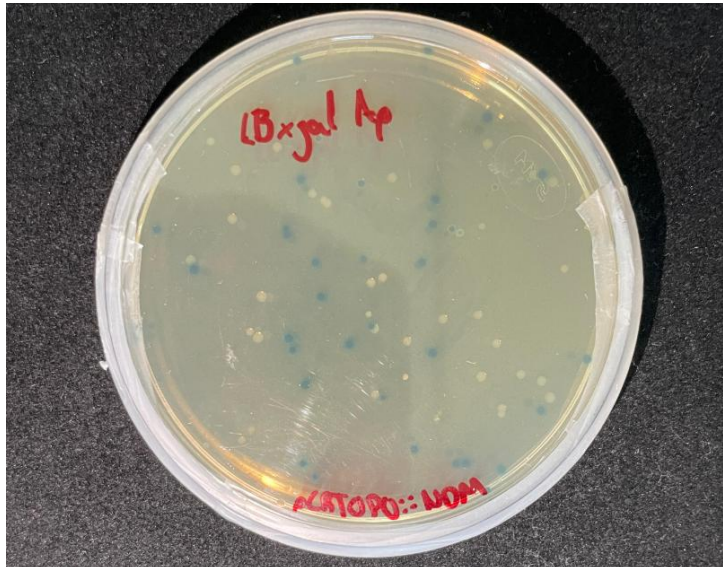


Figura 8. Colonias de bacterias *E.coli* DH5 α con el plásmido pCR2.1-TOPO al que se le clonó el gen *bla*_{NDM-1}. Placa con medio LB, X-gal, ampicilina y kanamicina.

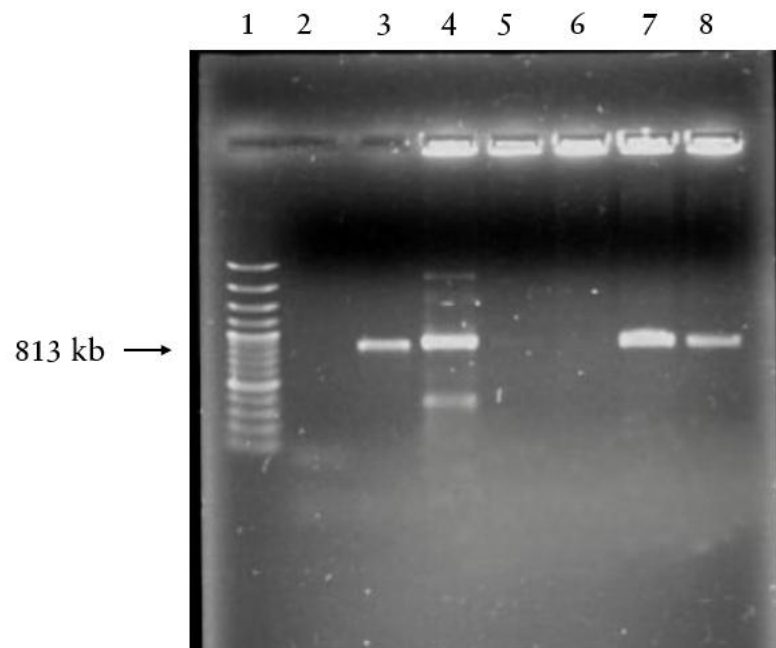


Figura 9. Electroforesis de gel de agarosa al 1% del producto de PCR a partir de las colonias transformadas con el plásmido pCR2.1-TOPO ::ndm1. Carril 1 marcador de peso

molecular, **carril 2** control negativo, **carril 3** control positivo (amplificación *bla*_{NDM-1} a partir de cepa AN54), **carril 4** amplificación positiva de *bla*_{NDM-1} de PCR colonia 1, **carriles 5 y 6** amplificación negativa de *bla*_{NDM-1} de PCR de colonia 2 y 3, **carriles 7 y 8** amplificación positiva de *bla*_{NDM-1} de PCR colonia 4 y 5.

6.9 Comprobación de la construcción por restricción enzimática

La restricción enzimática del plásmido pCR2.1-TOPO se realizó con las enzimas de restricción XhoI y KpnI, la digestión con ambas enzimas en el plásmido produjo 2 fragmentos de aproximadamente 4000 kb y 800 kb. Para ver el producto de la digestión se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 10).

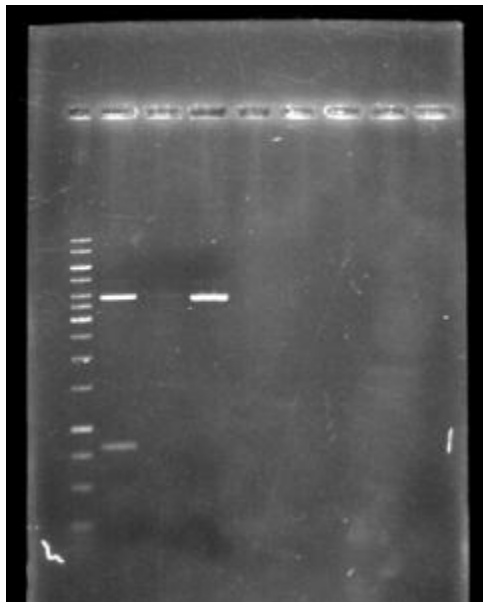


Figura 10. Digestión enzimática del vector pCR2.1-TOPO::ndm1 con las enzimas Xho y Kpn. Gel de agarosa al 1% y TAE 1x. **Carril 1** marcador de peso Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder, **carril 2** plásmido pCR2.1-TOPO::ndm1 digerido con Xho I y Kpn I, **carril 3** control negativo, **carril 4** plásmido pCR2.1-TOPO digerido con XhoI y KpnI.

7 Discusión.

Debido al uso indiscriminado de antibióticos, la resistencia a los antibióticos en las bacterias va en aumento y muchos de los antibióticos utilizados en el pasado ya no son eficaces. El descubrimiento de nuevos antibióticos no ha podido seguir el ritmo de la aparición de patógenos resistentes a los antibióticos y estamos avanzando hacia una etapa en la que ya no es capaz de curar un gran número de infecciones bacterianas. (Chattopadhyay *et al.*, 2015; Yoneyama y Katsumata, 2006). Las NDM son una de las enzimas más importantes que confieren resistencia a los antibióticos, presentes en una amplia gama de patógenos humanos, y su prevalencia está aumentando en todo el mundo (Wang *et al.*, 2025). Creemos que el estudio inmunoinformático de esta proteína puede aportar conocimiento para posteriormente proponer soluciones contra la resistencia bacteriana para reducir la carga de esta crisis sanitaria mundial. Numerosos estudios han utilizado métodos inmunoinformáticos para trabajar tanto con la proteína NDM, como con *Acinetobacter spp.* principalmente en los campos como diseño de vacunas, mapeo de epítopes, respuesta inmune y caracterización molecular (Fataholi *et al.*, 2021; Motamedi *et al.*, 2023; Beikzadeh, 2023). En este trabajo se tuvo como objetivo el evaluar la respuesta inmune producida por NDM, se utilizaron herramientas bioinformáticas para encontrar epítopes que estimulan de forma adecuada y específica el sistema inmunitario contra las NDM y que se encuentran en la parte más externa de la estructura terciaria de la proteína. Dado que la presentación de epítopes no protectores desvía la potencia del sistema inmunitario y disminuye la afinidad antígeno (Ag) - anticuerpo (Ab), por este motivo, la identificación precisa de los epítopes inmunogénicos es muy importante (Ahmad *et al.*, 2016). En los últimos años, se ha desarrollado el uso de herramientas bioinformáticas para la predicción de los epítopes inmunogénicos más potentes (Soria *et al.*, 2015; Pappalardo *et al.*, 2016). Y se han realizado varios estudios para predecir epítopes antigénicos para NDM-1 y para *Acinetobacter spp.* principalmente en el campo de desarrollo de vacunas (Motamedi *et al.*, 2023; Fathollahi *et al.*, 2021; Barrios *et al.*, 2014).

La variación en la longitud del péptido es importante para la función de los epítopes antigénicos para provocar la respuesta inmunitaria. Las longitudes de los epítopes predichos deben ser preferentemente de entre 7-12 mer para la unión al MHC de clase I

porque el surco de unión a péptidos del MHC de clase I no permite la variación en la longitud de los péptidos. La mayoría de las moléculas HLA tienen una fuerte preferencia por la unión a epítopes con longitudes de 9 mers. (Nielsen y *Andreatta.*, 2016; Chang *et al.*, 2006). De nuestros once epítopes predichos, siete se encuentran en el rango óptimo de longitud y de los siete dentro del rango, cuatro tienen la longitud de fuerte preferencia a unión a las moléculas de HLA. Lo que pudiera sugerir que se generará una respuesta inmune en nuestro próximo estudio de obtener anticuerpos.

AllerTOP es el primer servidor sin alineación para la predicción *in silico* de alérgenos basada en las principales propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Además de la alergenicidad, AllerTOP es capaz de predecir la vía de exposición al alérgeno: alimento, inhalante o toxina (Dimitrov *et al.* 2013). Dimitrov *et al.* (2014) realizaron un estudio donde se comparó el rendimiento de AllerTop con el de nueve servidores web de libre acceso utilizando el conjunto total de 2.427 alérgenos y 2.427 no alérgenos. Los servidores se compararon en términos de sensibilidad, especificidad, ppv (*positive predictive value*), F1 y MCC (*Matthews correlation coefficient*). Dando como resultado que fue el tercero más sensible (87.6%), el cuarto con más especificidad (90.7%), el más preciso (88.7%), y el tercero en términos de ppv (0.903). Utilizando el estadístico F1, AllerTOP es de nuevo el método con mejores resultados (0.885). Por último, los valores de MCC muestran que AllerTOP es el que mejor funciona (0.775). Así que, aunque AllerTOP no es el primero en cada estadística, obtiene buenos resultados en cada medida y no muestra la alta variabilidad que caracteriza a la mayoría de los demás servidores, por eso, es que se decidió ocupar este servidor sobre las otras opciones. En cuanto al uso de AllerTop para la evaluación de NDM, se han reportado numerosos estudios, principalmente para diseño de vacunas como el hecho por Fathollahi *et al.* (2021), Motamedi *et al.* (2023) o Naveed *et al.* (2023). En cuanto a *Acinetobacter*, Naveed *et al.* (2023) evaluaron la alergenicidad de la proteína OmpA usando AllerTop, estableciendo así un precedente para el análisis de proteínas de este género bacteriano, esto valida nuestro enfoque de utilizar AllerTOP en la evaluación inmunogénica de NDM-1 en *A. haemolyticus*.

La predicción de la toxicidad de péptidos es un paso fundamental en el uso de proteínas en biomodelos, así, ToxinPred surge como una herramienta bioinformática basada en

máquinas de vectores de soporte, entrenada con un conjunto de 1805 péptidos tóxicos, que permite evaluar la toxicidad de epítopes en función de sus propiedades fisicoquímicas. Además, ofrece la posibilidad de identificar mutaciones específicas para modular su toxicidad, ya sea aumentándola o disminuyéndola según los requerimientos experimentales (Anand *et al.*, 2024; Gupta *et al.*, 2013).

Esta plataforma ha sido empleada previamente en estudios relacionados con NDM-1, como en el trabajo de Basu *et al.* (2022), donde se utilizó para diseñar péptidos antimicrobianos dirigidos contra beta-lactamasas de importancia clínica en bacterias gram negativas. También, otros investigadores han combinado ToxinPred con herramientas como VaxiJen y AllerTop para el desarrollo de vacunas basadas en epítopes, un ejemplo es el estudio de Motamedi *et al.* (2023), que empleó estas plataformas para diseñar una vacuna multiepitópica contra metalo-betalactamasas. Sin embargo, no todos los estudios recurren a las mismas estrategias de predicción. Por ejemplo, Fathollahi *et al.* (2021) utilizaron VaxiJen y AllerTop para el diseño *in silico* de una vacuna contra NDM-1, pero en lugar de utilizar ToxinPred como en este estudio, evaluaron la toxicidad mediante la plataforma ToxDL. Esta variabilidad metodológica refleja la importancia de seleccionar herramientas bioinformáticas según los objetivos específicos del estudio y la disponibilidad de algoritmos validados.

Para evaluar la posible inmunogenicidad se usó la plataforma C-IMMSIMM, un servidor que puede simular o predecir cómo reaccionaría el sistema inmunológico humano frente a un posible inmunógeno. Las respuestas que se pueden observar incluyen las respuestas humorales y celulares, así como diversas moléculas generadas como anticuerpos y citocinas. Las respuestas inmunológicas tanto innata como adquirida, mediadas por células, están estrechamente relacionadas con la capacidad del hospedero para resistir infecciones (Amezcuca *et al.*, 2012), además, las células B y los anticuerpos tienen un papel fundamental en la eliminación de bacterias y en la supervivencia del hospedero. También las células B pueden afectar directamente a las células dendríticas y T, lo que influye en la inmunidad adaptativa (Youinou, 2007). Como se puede observar en la figura 4, tras la inmunización se observó un fuerte aumento de la población de linfocitos B, incluidos los linfocitos B de memoria, lo que indica el potencial de cambio de

isotipo y formación de memoria. El modelo obtenido indica que es probable que se active la memoria de las células B. Las células B han reportado ser de vital importancia en la protección temprana frente a la infección por *A. baumannii* y teniendo un papel importante en la eliminación de *A. baumannii* del pulmón, el hígado y el bazo y en prevenir la diseminación extrapulmonar de *A. baumannii* tras la infección (Islam *et al.*, 2025), por lo que es importante la expresión de linfocitos B como ha ocurrido en nuestra simulación.

Para la respuesta del perfil de las inmunoglobulinas, se reconoció a la proteína como antígeno, siendo lo esperado y ya reportado por otros autores en *Acinetobacter spp.* como Magda (2022). También, mostró una respuesta rápida y alta de IgM y para IgG una respuesta un poco más lenta y menor de isotipo IgM en la proteína, esta respuesta en los anticuerpos es algo esperado cuando se presenta una infección en un biomodelo, además, de presentar una respuesta hasta el día cuatro después de la inmunización (Liu *et al.*, 2020). Otros autores han reportado este mismo patrón en la respuesta en niños (Aksu *et al.*, 2006) lo cual podría ser útil para la generación de una vacuna a partir de anticuerpos para *Acinetobacter spp.* Finalmente, cuando el sistema inmune reconoce un antígeno, es normal que, como respuesta, los niveles de IgG, IgA e IgM se eleven en comparación a un individuo “sano” o que no está reconociendo un antígeno, principalmente en el isotipo IgG (Hughes *et al.*, 2001).

Según (Figura 4), los niveles de las poblaciones de células TH (helper) y TC (citotóxicas) también aumentaron significativamente con respecto al desarrollo de la memoria, se presentó una gran activación tanto en el estado activo como en el estado de reposo. Estudios anteriores han reportado el impacto de *Acinetobacter* en las células dendríticas humanas, reportando una activación de la respuesta de tipo TH1 (Debarry *et al.*, 2010), así como proteínas de membrana externa de *Acinetobacter* asociadas a la citotoxicidad (Choi *et al.*, 2008). Además, en un estudio se reportó que ratones inmunizados con la proteína NDM-1 producían células T – Helper 17, esto se alinea con los resultados obtenidos ya que también hay una producción de células T–Helper (Chen *et al.*, 2011).

Finalmente, se observa un aumento significativo del interferón gamma (IFN- γ) y un aumento moderado de la interleucina-2 (IL-2) (Figura 4) después de la inmunización. En

trabajos anteriores se ha identificado que el IFN- γ es necesario para la resistencia del hospedero a la infección virulenta por *A. baumannii* (Li *et al.*, 2018). También, se ha demostrado la necesidad de IFN- γ en la mediación de la respuesta inmune, la muerte celular y la activación de proteínas bactericidas inducidas por IFN- γ (Li *et al.*, 2024). El IFN- γ se ha mostrado como una citocina extremadamente versátil que puede llevar a cabo muchas actividades biológicas no redundantes con otros interferones. La literatura está llena de informes que destacan su importancia en las patologías de la enfermedad. En consecuencia, cualquier fallo en el sistema IFN- γ -IFN- γ R dificulta gravemente la respuesta inmunitaria del hospedero frente a las infecciones. Así pues, su relevancia en lo que respecta a conferir inmunidad protectora en enfermedades infecciosas y cánceres es indiscutible (Kak *et al.*, 2018). El IFN- γ desempeña un papel importante en la respuesta innata del hospedero a las infecciones por bacterias. Los ratones mutantes con alteraciones genéticas en el IFN- γ , el receptor del IFN- γ o el factor de transcripción Stat-1 (todos ellos necesarios para la expresión genética inducible por el IFN- γ) tienen una capacidad significativamente menor para generar una respuesta inmunitaria eficaz contra las infecciones microbianas (Kak *et al.*, 2018; Meraz *et al.*, 1996; Olias *et al.*, 2016). En 2023, Ma *et al.* Concluyeron que la intoxicación por monóxido de carbono y la infección pulmonar provocan un aumento de la síntesis de TGF- β 1 en los pacientes, lo que activa la transducción de señales de la vía TGF- β 1/Smads para que surjan respuestas inflamatorias (Ma *et al.*, 2023). La IL-4 y el IFN- γ ha reportado tener función en la defensa del hospedero frente a *Acinetobacter*, aunque las funciones precisas siguen siendo inciertas y merecen una mayor investigación. También, el IFN- γ y la IL-4 participan como inductores en la propagación de epítopes de células T para *Acinetobacter* (Lin *et al.*, 2013). Ha habido experimentos animales que han revelado que los ratones deficientes en IL-10 pretratados con *A. Iwoffii*, no desarrollaron protección contra la inflamación de las vías respiratorias, lo que sugiere que la IL-10 desempeña un papel importante en la mediación de los efectos de *A. Iwoffii* de la IL-6. Así pues, la IL-6 podría ser un importante modulador del sistema inmunitario adaptativo en la dirección no alérgica/antialérgica (Alashkar *et al.*, 2023). Todos estos datos nos dan la evidencia *in silico* de que la proteína sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria eficaz capaz de proteger contra la enfermedad.

Aunque no se han reportado estudios del uso de C-IMMSIMM para evaluar únicamente NDM-1, en 2021, Fathollahi *et al.* estudiaron el desarrollo de una vacuna que pueda provocar respuestas inmunitarias fuertes y específicas contra las NDM bajo un enfoque inmunoinformático, en este estudio se incluyeron las 28 variantes de NDM para la simulación. Ambos trabajos demostraron que hay una respuesta y activación del sistema inmune.

Por otro lado, al conocer que la proteína NDM-1 puede activar la respuesta inmune, en este trabajo se empezó a realizar la clonación del gen *bla*_{NDM-1}, con el fin de obtener la proteína recombinante para inmunizar conejos y obtener anticuerpos para su uso en estudios posteriores.

Los métodos tradicionales de clonación basados en enzimas de restricción presentan limitaciones significativas, como un bajo rendimiento y un proceso laborioso que requiere evaluar múltiples colonias para identificar el inserto de interés (Bolivar y Backman, 1979; Rodriguez y Denhardt, 2014). A pesar de estas desventajas, *bla*_{NDM-1} ha sido clonado exitosamente en diversos vectores mediante esta metodología. Por ejemplo, Grigorenko *et al.* (2016) lo insertaron en el vector pET utilizando las enzimas NdeI/EcoRI, pero ocupando la misma metodología de clonación a partir de amplificación de banda de PCR y transformación en la cepa DH5a de *E.coli*; mientras que Yong *et al.* (2009) emplearon el vector pK18 con las enzimas BamHI, EcoRI y HindIII, ambos casos a partir de *Klebsiella pneumoniae*.

Cuando se usa un vector de mantenimiento, antes de comenzar la digestión de restricción y el proceso de ligación, se debe elegir cuidadosamente el vector y el inserto; ambos deben tener sitios de corte compatibles para las enzimas de restricción que permitan que el inserto se coloque en la columna en la orientación adecuada, esto es ideal para varias cosas como aprovechar una amplia gama de vectores y sistemas de expresión, especificidad para planificar y construir clonas basados en cada diseño experimental o también para reutilizar las clonas para crear construcciones más complejas o a medida que cambien las necesidades experimentales (Preston, 2003).

Una alternativa eficiente a la clonación tradicional es el sistema pCR2.1-TOPO, que simplifica el proceso en tres pasos: mezcla del producto de PCR con el vector, incubación

breve y transformación en *E. coli*. Este método no solo es rápido, sino también versátil, permitiendo su uso en subclonación, secuenciación y transcripción *in vitro* (Balwant, 2009; Wu *et al.*, 2010). De hecho, el vector pCR2.1-TOPO ha sido empleado previamente en la clonación de genes *bla*_{NDM}, como lo demostró Cuzon *et al.* (2013) al identificar una nueva variante de beta-lactamasa tipo NDM asociada a un fondo genético cercano similar a los descritos entre los genes *bla*_{NDM-1}.

El gen *bla*_{NDM-1} ha sido clonado a partir de otros géneros bacterianos además de *K. pneumoniae*. Por ejemplo, Wang *et al.* (2021) reportaron su clonación del vector pET28a y *bla*_{NDM} desde *E. coli*, mientras que Zhou *et al.* (2012) lo insertaron en el plásmido pGEX-4T a partir de *Acinetobacter junii* de aislados de pacientes infantiles en China. En este contexto, no es la primera vez que se utiliza el vector pCR2.1-TOPO para clonar *bla*_{NDM-1} de *Acinetobacter*, Dortet *et al.* (2012) sugirieron que la carbapenemasa emergente NDM-1 es seleccionada por moléculas similares a la bleomicina y que los productores de NDM se adapta mejor a diversos entornos, para esto se clonaron los genes *bla*_{NDM-1}. La diferencia entre el trabajo de Dortet *et al.* y éste, es que se ocuparon oligonucleótidos diferentes ya que en este estudio se agregaron sitios de restricción y en el trabajo de Dortet se ocuparon cuatro regiones codificantes diferentes, además que la selección de colonias transformantes en el trabajo de Dortet *et al.* fue únicamente con el antibiótico kanamicina mientras que en este trabajo fue con kanamicina y ampicilina. Además, que posteriormente, en este trabajo se ocupó X-gal para diferenciar las colonias positivas de las negativas, a pesar de las diferencias en ambos trabajos se logró una clonación estable. Esta construcción es importante porque es el antecedente para poder clonarse en un vector de expresión y con esto poder generar anticuerpos.

8. Conclusiones

El presente trabajo de investigación cumplió con sus objetivo general y particulares, proporcionando avances en la caracterización y preparación de la proteína NDM-1 de *Acinetobacter haemolyticus* para su posterior aplicación en el desarrollo de herramientas de diagnóstico y potenciales intervenciones terapéuticas.

La evaluación inmunogénica *in silico* de la proteína NDM-1 arrojó resultados positivos. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas avanzadas y algoritmos predictivos, se pudo determinar que esta beta-lactamasa de tipo metalo-enzima provoca una buena activación del sistema inmunitario. El análisis exhaustivo de su secuencia aminoacídica reveló la presencia de múltiples epítomos de linfocitos B, lo que sugiere una alta probabilidad de ser reconocida eficazmente por el sistema inmune humoral. Asimismo, la predicción de epítomos para linfocitos T demostró una fuerte afinidad por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), indicando la capacidad de la proteína para estimular una respuesta celular. Este perfil (humoral y celular) es fundamental para una inmunogenicidad efectiva.

Complementariamente, los estudios predictivos del perfil de citocinas inducido por estos epítomos apuntaron hacia una respuesta de tipo Th1, asociada a la activación de macrófagos y a la inmunidad celular, lo que podría ser beneficioso para combatir infecciones intracelulares. Otra conclusión crítica para la seguridad futura fue la determinación que la proteína NDM-1 no presenta características alergénicas. Además, los análisis de toxicidad predictiva confirmaron que la biomolécula es no tóxica para su administración en un biomodelo experimental. Estas evaluaciones bioinformáticas constituyen evidencia preliminar que valida a la proteína NDM-1 como un candidato vacunal o inmunógeno ideal para la generación de anticuerpos policlonales en un huésped animal, ya que se anticipa que provocará una respuesta inmune potente, específica y sin efectos adversos significativos.

Como base fundamental para la fase aplicativa de esta investigación, se ejecutó con éxito la clonación del gen blaNDM-1. Utilizando la tecnología de clonación TOPO-TA, se logró insertar el gen de interés en el vector pCR2.1-TOPO, creando el constructo pCR2.1-TOPO::ndm-1. La verificación de esta clonación mediante técnicas como la digestión con enzimas de restricción confirmó la correcta inserción del gen en el vector. Esta parte es importante, ya que el vector de clonación resultante no solo sirve como un sistema de mantenimiento y almacenamiento estable del gen, sino que sienta las bases para la siguiente etapa, la subclonación en un vector de expresión en una cepa huésped adecuada. La obtención de esta proteína recombinante en cantidades suficientes sería el próximo paso para validar experimentalmente *in vivo* e *in vitro* las predicciones inmunoinformáticas realizadas en este estudio.

En resumen, el presente trabajo describió las propiedades inmunológicas de la proteína NDM-1 *in silico*, observando que es inmunogénica debido al perfil de inmunoglobulinas y de citocinas generados bioinformaticamente, además se encontró que esta biomolécula no es alergena y no es tóxica para su administración en un biomodelo. Por

lo cual la proteína NDM-1 puede ser utilizada para generar anticuerpos policlonales en un biomodelo. Además, con el fin de obtener la proteína recombinante NDM-1, se construyó el vector de clonación pCR2.1-TOPO::ndm-1.

9. Perspectivas

Generar un vector de expresión para el gen *bla*_{NDM-1} para obtener la proteína recombinante de NDM-1.

Purificar la proteína recombinante.

Realizar la inmunización con la proteína NDM-1 para la generación de anticuerpos policlonales.

Caracterizar los anticuerpos obtenidos posterior a la inmunización.

10. Referencias

- Adli, M. (2023). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Biotechnology*, 41(2), 146-159. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01511>
- Ahmad TA, Eweida AE, Sheweita SA. *Trials Vaccinol*. 2016;5:71– 83.
- Aksu, G., Genel, F., Koturoğlu, G., Kurugöl, Z., & Kütükçüler, N. (2006). Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 48(1), 19-24. <https://turkijpediatr.org/article/view/2590>
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M. L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of non-baumannii *Acinetobacter* species. *Front Microbiol*. 2016; 7: 49.
- Alashkar Alhamwe B, Gao Z, Alhamdan F, *et al*. Intranasal administration of *Acinetobacter lwoffii* in a murine model of asthma induces IL-6-mediated protection associated with cecal microbiota changes. *Allergy*. 2023; 78: 1245-1257. doi:[10.1111/all.15606](https://doi.org/10.1111/all.15606)
- Allen, D., and B. Hartman. 2000. *Acinetobacter* Species, p. 215– 324. In Mandell, G.L., J.E. Bennett, R. Dolin (ed.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA.
- Ambler RP (1980) The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289(1036): 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Amezcuca Vesely MC, Bermejo DA, Montes CL, Acosta-Rodríguez E V., Gruppi A. (2012). B-cell response during protozoan parasite infections. *J Parasitol Res*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/362131
- Anand Singh Rathore, Shubham Choudhury, Akanksha Arora, Purva Tijare, Gajendra P.S. Raghava, ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides, *Computers in Biology and Medicine*, Volume 179, 2024, 108926, ISSN 0010-4825, <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.108926>.
- Anandan, A., & Vrielink, A. (2020). Structure and function of lipid A-modifying enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1459(1), 19-37.
- Antonoplis A, Zang X, Wegner T, Wender PA, Cegelski L. Vancomycin-Arginine Conjugate Inhibits Growth of Carbapenem-Resistant *E. coli* and Targets Cell-Wall Synthesis. *ACS Chem Biol*. 2019 Sep 20;14(9):2065-2070. doi: 10.1021/acscchembio.9b00565. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31479234; PMCID: PMC6793997.
- Baumann, P., M. Doudoroff, and R.Y. Stanier. 1968. A study of the *Moraxella* group. II Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol*. 95:1520–1541.
- Barrios, Humberto PhD; Silva-Sanchez, Jesus PhD; Reyna-Flores, Fernando Biol; Sanchez-Perez, Alejandro Quim; Sanchez-Francia, Domingo QBP; Aguirre-Torres, Jesús A. TLC; Sánchez-Rogel, José TLC; Garza-Ramos, Ulises PhD. Detection of a NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST22) Clinical Isolate at a Pediatric Hospital in Mexico. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 33(3):p 335, March 2014. | DOI: 10.1097/INF.0000000000000173

- Basu, S., Joshi, S.M., Ramaiah, S. *et al.* Designing Anti-Microbial Peptides Against Major β -Lactamase Enzymes in Clinically Important Gram-Negative Bacterial Pathogens: An In-Silico Study. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **14**, 263–276 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09929-1>
- Bazmara, H., Rasooli, I., Jahangiri, A., Sefid, F., Astaneh, S. D. A., & Payandeh, Z. (2019). Antigenic properties of iron regulated proteins in *Acinetobacter baumannii*: an in silico approach. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(1), 205-213.
- Beikzadeh, B. Immunoinformatics design of multi-epitope vaccine using OmpA, OmpD and enterotoxin against non-typhoidal salmonellosis. *BMC Bioinformatics* 24, 63 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05183-6>
- Bello López, M. (2019). Estudio de las bases genéticas de la resistencia en cepas de *Acinetobacter* spp. circulantes en áreas hospitalarias y pacientes ambulatorios. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4744>
- Bello-López, E., Castro-Jaimes, S., Cevallos, M. Á., Rocha-Gracia, R. del C., Castañeda-Lucio, M., Sáenz, Y., ... Lozano-Zarain, P. (2019). Resistome and a Novel blaNDM-1-Harboring Plasmid of an *Acinetobacter haemolyticus* Strain from a Children's Hospital in Puebla, Mexico. *Microbial Drug Resistance*. doi:10.1089/mdr.2019.0034
- Bello-López, E., Rocha-Gracia, R. del C., Castro-Jaimes, S., Cevallos, M. Á., Vargas-Cruz, M., Verdugo-Yocupicio, R., ... Lozano-Zarain, P. (2020). Antibiotic resistance mechanisms in *Acinetobacter* spp. strains isolated from patients in a pediatric hospital from Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. doi:10.1016/j.jgar.2020.08.014
- Bergogne-Bérézin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148–165. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.2.148>
- Bernaschi M., F. Castiglione. "Design and implementation of an immune system simulator". In: *Computers in Biology and Medicine* 31.5 (2001), pp. 303–331. ISSN: 0010-4825. DOI: 10.1016/S0010-4825(01)00011-7.
- Bertero, A., Brown, S., & Vallier, L. (2017). Methods of cloning. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 19-39). Academic Press.
- Bing Wang, Dongchang Sun. Detection of NDM-1 carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii* in environmental samples from livestock farms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 70, Issue 2, February 2015, Pages 611–613, <https://doi.org/10.1093/jac/dku405>
- Bhamidimarri, S. P., Zahn, M., Prajapati, J. D., Schleberger, C., Söderholm, S., Hoover, J., ... & Van Den Berg, B. (2019). A multidisciplinary approach toward identification of antibiotic scaffolds for *Acinetobacter baumannii*. *Structure*, 27(2), 268-280.
- Bolivar, F., & Backman, K. (1979). [16] Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Recombinant DNA*, 245–267. doi:10.1016/0076-6879(79)68018-7

- Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*, 19(8), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Brouwer, M. S., Roberts, A. P., Hussain, H., Williams, R. J., Allan, E., & Mullany, P. (2013). Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nature communications*, 4(1), 2601.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211–1233
- Bush, K. and Jacoby, G.A.(2010). Updated functional classification of betalactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:969-76
- Bush K, Fisher JF (2011) Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-Negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 65(1):455–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>
- Castiglione F., F. Celada. *Immune System Modelling and Simulation*. Taylor & Francis Group, 2020. ISBN: 9780367738389.
- Chancey, S. T., Zähler, D., & Stephens, D. S. (2012). Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. *Future microbiology*, 7(8), 959-978.
- Chang ST, Ghosh D, Kirschner DE, Linderman JJ. Peptide length-based prediction of peptide-MHC class II binding. *Bioinformatics*. 2006 Nov 15;22(22):2761-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btl479. Epub 2006 Sep 25. PMID: 17000752.
- Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S., & Basu, S. (2017). *Acinetobacter baumannii* transfers the bla NDM-1 gene via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2201-2207.
- Chattopadhyay MK, Chakraborty R, Grossart H-P, Reddy GS, Jagannadham MV. Antibiotic resistance of bacteria. *BioMed Res Int.* 2015;2015:501658.
- Chapartegui-González, I., Lázaro-Díez, M., Bravo, Z., Navas, J., Icardo, J. M., & Ramos-Vivas, J. (2018). *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PlosOne*, 13(8), e0201961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961>
- Chen, K., McAleer, J. P., Lin, Y., Paterson, D. L., Zheng, M., Alcorn, J. F., ... & Kolls, J. K. (2011). Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. *Immunity*, 35(6), 997-1009.
- Chiacchio, F., Pennisi, M., Russo, G., Motta, S., & Pappalardo, F. (2014). Agent-based modeling of the immune system: NetLogo, a promising framework. *BioMed research international*, 2014, 907171. <https://doi.org/10.1155/2014/907171>
- Choi, C.H., Hyun, S.H., Lee, J.Y., Lee, J.S., Lee, Y.S., Kim, S.A., Chae, J.-P., Yoo, S.M. and Lee, J.C. (2008), *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cellular Microbiology*, 10: 309-319. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x>

- Coculescu, B. I. (2009). Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *Journal of medicine and life*, 2(2), 114.
- Cuenca, F. F., Pascual, A., Martínez, L. M., Conejo, M. C., & Perea, E. J. (2003). Evaluation of SDS-polyacrylamide gel systems for the study of outer membrane protein profiles of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 43(3), 194-201.
- Cuzon G, Bonnin RA, Nordmann P (2013) First Identification of Novel NDM Carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *PLoS ONE* 8(4): e61322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061322>
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., ... & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461.
- Debarry, J., Hanuszkiewicz, A., Stein, K., Holst, O. and Heine, H. (2010), The allergy-protective properties of *Acinetobacter lwoffii* F78 are imparted by its lipopolysaccharide. *Allergy*, 65: 690-697. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02253.x>
- Dehbashi, S.; Tahmasebi, H.; Alikhani, M.Y.; KeramatF.and Arabestani, M.R. (2020). Distribution of class B and class A β -lactamases in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of phenotypic methods and High-Resolution Melting Analysis (HRMA) assay. *Infect. Drug Resist.*13: 2037–2052
- Dimitrov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2013). AllerTOP--a server for in silico prediction of allergens. *BMC bioinformatics*, 14 Suppl 6(Suppl 6), S4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S6-S4>
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D.R. *et al.* AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. *J Mol Model* **20**, 2278 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
- Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 88-94.
- Dusek, J.; Plchova, H.; Cerovska, N.; Poborilova, Z.; Navratil, O.; Kratochvilova, K.; Gunter, C.; Jacobs, R.; Hitzeroth, I. I.; Rybicki, E. P.; Moravec, T. (2020) Extended Set of GoldenBraid Compatible Vectors for Fast Assembly of Multigenic Constructs and Their Use to Create Geminiviral Expression Vectors. *Front. Plant Sci.*, DOI: 10.3389/fpls.2020.522059
- Deshmukh, D.G.; Damle, A.S.; Bajaj, J.K.; Bhakre, J.B. and Patwardhan, N.S. (2011). Metallo- β -lactamase producing clinical isolates from patients of a tertiary care hospital. *J. lab. phys.* 3: 93.
- Dheda, K., Gumbo, T., Maartens, G., Dooley, K. E., McNerney, R., Murray, M., Furin, J., Nardell, E. A., London, L., Lessem, E., Theron, G., van Helden, P., Niemann, S., Merker, M., Dowdy, D., Van Rie, A., Siu, G. K., Pasipanodya, J. G., Rodrigues, C., Clark, T. G., Warren, R. M. (2017). The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable

- tuberculosis. *The Lancet. Respiratory medicine*, S2213-2600(17)30079-6. Advance online publication. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30079-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30079-6)
- Dortet L, Nordmann P, Poirel L. 2012. Association of the Emerging Carbapenemase NDM-1 with a Bleomycin Resistance Protein in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56. <https://doi.org/10.1128/aac.05583-11>
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2009). Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 839–848.
- Drawz SM, Bonomo RA. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:160–201.
- Eliopoulos, G. M., & Huovinen, P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical infectious diseases*, 32(11), 1608-1614.
- Espinal, P., Roca, I., & Vila, J. (2011). Clinical Impact and Molecular Basis Of Antimicrobial Resistance In Non-Baumannii *Acinetobacter*. *Future Microbiology*, 6(5), 495–511. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.30>
- Fathollahi, M., Fathollahi, A., Motamedi, H. *et al.* In silico vaccine design and epitope mapping of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM): an immunoinformatics approach. *BMC Bioinformatics* 22, 458 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04378-z>
- Farhat, N., & Khan, A. U. (2020). Evolving trends of New Delhi Metallo-betalactamse (NDM) variants: A threat to antimicrobial resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 86, 104588. doi:10.1016/j.meegid.2020.104588
- Fuchsman, C. A., Collins, R. E., Rocap, G., & Brazelton, W. J. (2017). Effect of the environment on horizontal gene transfer between bacteria and archaea. *PeerJ*, 5, e3865. <https://doi.org/10.7717/peerj.3865>
- Fernández-Villa, D., Aguilar, M. R., & Rojo, L. (2019). Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *International journal of molecular sciences*, 20(20), 4996. <https://doi.org/10.3390/ijms20204996>
- Fonseca LL, Joyner CJ, Galinski MR, Voit EO. A model of *Plasmodium vivax* concealment based on *Plasmodium cynomolgi* infections in *Macaca mulatta*. *Malar J.* 2017;16(1):375. doi:10.1186/s12936-017-2008-4
- Fowler RC, Hanson ND. Emergence of carbapenem resistance due to the novel insertion sequence ISPa8 in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 2014;9:e91299.
- Francis, A. I., Ghany, S., Gilkes, T., & Umakanthan, S. (2022). Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. *Postgraduate Medical Journal*, 98(1159), 389-394. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2021-140654>
- Galgano, M., Pellegrini, F., Catalano, E., Capozzi, L., Del Sambro, L., Sposato, A., Lucente, M. S., Vasinioti, V. I., Catella, C., Odigie, A. E., Tempesta, M., Pratelli, A., & Capozza, P. (2025). Acquired Bacterial Resistance to Antibiotics and Resistance Genes: From Past to Future. *Antibiotics*, 14(3), 222. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14030222>

- Gallego, L., and K.J. Towner. 2001. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. *J. Med. Microbiol.* 50:71–77.
- Ghiasi, S. M., Valizadeh, R., Arabsorkhi, Z., Hoseinpour, A., Esfandiari, K., Sadatpour, O., & Hosseini, S. (2021). Efficacy and side effects of Sputnik V, Sinopharm and AstraZeneca vaccines to stop COVID-19; a review and discussion. *Immunopathologia Persa*, 7(2), e31. <https://doi.org/10.34172/ipp.2021.31>
- Goel, V. K., & Kapil, A. (2001). Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. *BMC microbiology*, 1(1), 16.
- González, L. J., Bahr, G., Nakashige, T. G., Nolan, E. M., Bonomo, R. A., & Vila, A. J. (2016). Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase. *Nature chemical biology*, 12(7), 516-522.
- Grigorenko, V.G., Rubtsova, M.Y., Filatova, E.V. *et al.* Cloning and expression of NDM-1 metallo- β -lactamase gene and study of the catalytic properties of the recombinant enzyme. *Moscow Univ. Chem. Bull.* **71**, 104–109 (2016).
- Grotiuz, G., A. Sirok, P. Gadea, G. Varela, and F. Schelotto. 2006. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 44:3838–3841.
- Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, *et al.* (2013) *In Silico* Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLOS ONE* 8(9): e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
- Hamed, R.B.; Gomez-Castellanos; J.R.; Henry, L.; Ducho, C.; McDonough, M.A. and Schofield, C.J. (2013). The enzymes of β -lactam biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 30:21–107.
- Hegde NR, Gauthami S, Sampath Kumar HM, Bayry J. The use of databases, data mining and immunoinformatics in vaccinology: where are we? *Expert Opin Drug Discov.* 2018;13(2):117–130. doi:10.1080/17460441.2018.1413088
- Hu H, Hu Y, Pan Y, Liang H, Wang H, Wang X, Hao Q, Yang X, Yang X, Xiao X, Luan C, Yang Y, Cui Y, Yang R, Gao GF, Song Y, Zhu B. 2012. Novel Plasmid and Its Variant Harboring both a blaNDM-1 Gene and Type IV Secretion System in Clinical Isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56: .<https://doi.org/10.1128/aac.06199-11>
- Hughes LE, Bonell S, Natt RS, Wilson C, Tiwana H, Ebringer A, Cunningham P, Chamoun V, Thompson EJ, Croker J, Vowles J. 2001. Antibody Responses to *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in Multiple Sclerosis: Prospects for Diagnosis Using the Myelin-*Acinetobacter*-Neurofilament Antibody Index. *Clin Diagn Lab Immunol* 8. <https://doi.org/10.1128/cdli.8.6.1181-1188.2001>
- Hülter, N., İlhan, J., Wein, T., Kadibalban, A. S., Hammerschmidt, K., & Dagan, T. (2017). An evolutionary perspective on plasmid lifestyle modes. *Current opinion in microbiology*, 38, 74-80.

- Imle A, Kumberger P, Schnellbacher ND, *et al.* Experimental and computational analyses reveal that environmental restrictions shape HIV-1 spread in 3D cultures. *Nat Commun.* 2019;10(1):2144. doi:10.1038/s41467-019-09879-3
- Islam, A., Actis, L., & Wilson, T. J. (2025). Essential Role of B Cells in Early Defense Against *Acinetobacter baumannii* Pulmonary Infections. *bioRxiv*, 2025-01.
- Ito, R., Mustapha, M. M., Tomich, A. D., Callaghan, J. D., McElheny, C. L., Mettus, R. T., ... & Doi, Y. (2017). Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal. *MBio*, 8(4).
- Jabuk, S. I.A., jabuk, N.A.G., AL-Harmoosh, R. A. and Hussien, R.S. 2017.Isolation and Identification of antibiotic producing bacteria from local soil in Babylon province. *Euphrates Journal of Agriculture Science / Second Veterinary Conference*, 304-3010.
- Jacobs, M. R., Abdelhamed, A. M., Good, C. E., Rhoads, D. D., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Domitrovic, T. N., Rudin, S. D., Richter, S. S., van Duin, D., Kreiswirth, B. N., Greco, C., Fouts, D. E., & Bonomo, R. A. (2018). ARGONAUT-I: Activity of Cefiderocol (S-649266), a Siderophore Cephalosporin, against Gram-Negative Bacteria, Including Carbapenem-Resistant Nonfermenters and Enterobacteriaceae with Defined Extended-Spectrum β -Lactamases and Carbapenemases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(1), e01801-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01801-18>
- Kadhum, H. A., and Hasan, T. H. 2019. The Study of *Bacillus Subtilis* Antimicrobial Activity on Some of the Pathological Isolates. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 9(02), 193-196. <https://doi.org/10.25258/ijddt.9.2.12>
- Kak, G., Raza, M. & Tiwari, B. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 64-79. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>
- Kateete DP, Nakanjako R, Namugenyi J, Erume J, Joloba ML, Najjuka CF, *et al.* (2016). Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* at Mulago hospital in Kampala, Uganda (2007-2009). *Springerplus* .5:1308.
- Kelliny, S., Bobrovskaya, L., Zhou, XF. *et al.* Pharmacokinetic Modelling of Human Recombinant Protein, p75ECD-Fc: A Novel Therapeutic Approach for Treatment of Alzheimer's Disease, in Serum and Tissue of Sprague Dawley Rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 46, 235–248 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13318-020-00662-0>
- Kim, S. W., Lee, J. S., Park, S. B., Lee, A. R., Jung, J. W., Chun, J. H., ... & Jung, T. S. (2020). The importance of porins and β -lactamase in outer membrane vesicles on the hydrolysis of β -lactam antibiotics. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2822.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, *et al.* (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10: 597–602.
- Knapp, S., C.W. Wieland, S. Florquin, R. Pantophlet, L. Dijkshoorn, N. Tshimbalanga, S. Akira, and T. van der Poll. 2006. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *Am. J. Resp. Critic Care Med.* 173:122–129.

- Lambert P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>
- Lambert MS. Molecular biosafety-safety advance: transposon gene delivery systems. *Appl Biosaf* 2007;12:196–7.
- Landman, D., J.M. Quale, D. Mayonga, A. Adedeji, K. Vangala, and J. Ravishankar. 2002. City ward clonal outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn NY: The pre-antibiotic era has returned. *Arch. Int. Med.* 162:1515–1520
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., ... & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 55.
- Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 302(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>
- Li, Y., Guo, X., Hu, C., Du, Y., Guo, C., Wang, D., ... & Qi, X. (2018). Type I IFN operates pyroptosis and necroptosis during multidrug-resistant *A. baumannii* infection. *Cell Death & Differentiation*, 25(7), 1304-1318.
- Li, Tingting & Liu, Cheng & Lu, Jie & Gaurav, Gajendra & Chen, Wei. (2019). Determination of how tetracycline influences nitrogen removal performance, community structure, and functional genes of biofilm systems. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 106. 10.1016/j.jtice.2019.10.004.
- Li, FJ., Starrs, L., Mathur, A. *et al.* Interferon signalling and non-canonical inflammasome activation promote host protection against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. (2024). *Commun Biol* 7, 1494. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-07204-3>
- Liang, C, Zhang, X, Zhou, L, Meng, G, Zhong, L, and Peng, P. Trends and Correlation between Antibacterial Consumption and Carbapenem Resistance in Gram-Negative Bacteria in a Tertiary Hospital in China from 2012 to 2019. *BMC Infect Dis* (2021) 21(1):444. doi:10.1186/s12879-021-06140-5
- Limansky, A. S., Mussi, M. A., & Viale, A. M. (2002). Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *Journal of clinical microbiology*, 40(12), 4776-4778.
- Lin, L., Tan, B., Pantapalangkoor, P., Ho, T., Hujer, A. M., Taracila, M. A., ... Spellberg, B. (2013). *Acinetobacter baumannii* rOmpA vaccine dose alters immune polarization and immunodominant epitopes. *Vaccine*, 31(2), 313–318. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.008
- Liu, X., Wang, J., Xu, X., Liao, G., Chen, Y., & Hu, C. H. (2020). Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1269–1274. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1773324>
- Lomovskaya, O., Nelson, K., Rubio-Aparicio, D., Tsivkovski, R., Sun, D., & Dudley, M. N. (2020). Impact of Intrinsic Resistance Mechanisms on Potency of QPX7728, a New Ultrabroad-

Spectrum Beta-Lactamase Inhibitor of Serine and Metallo-Beta-Lactamases in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 64(6), e00552-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00552-20>

Ma, Chun-yan and Zhang, Xiao-yu and Guan, Xichao and Liu, Yan and Cui, Li, 20230260935, Chinese, Journal article, China, doi:10.3969/j.issn.1672-3619.2023.02.019, 1672-3619, 23, (2), Guangzhou, Journal of Tropical Medicine (Guangzhou), (226–230), Sun Yat-sen Medical Science of Sun Yat-sen University, Expression and correlation of serum TGF- β 1/Smads signaling pathway in CO poisoning patients with pulmonary infection., (2023)

Makalowski W, Pande A, Gotea V, Makalowska I. Transposable elements and their identification. *Methods Mol Biol* 2012;855: 337–59.

Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:3057–71.

MancillaRojano J, Flores V, Cevallos MA, Ochoa SA, ParraFlores J, ArellanoGalindo J, XicohtencatlCortes J and CruzC´ordova A () A bioinformatic approach to identify confirmed and probable CRISPR–Cas systems in the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex genomes. *Front. Microbiol.* 15:1335997. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1335997>

Marí-Almirall, M., Cosgaya, C., Higgins, P. G., Van Assche, A., Telli, M., Huys, G., ... & Vila, J. (2017). MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. áseifertii* and *A. ádijkshoorniae* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(3), 210-e1.

Mastrostefano E., A. Ravoni, E. Onofri, P. Tieri, and F. Castiglione. “Harnessing computational models to uncover the role of the immune system in tuberculosis treatment”. In: 2023 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM) 2 (Dec. 2023), pp. 3725–3732. DOI: 10.1109/BIBM58861.2023.10385440.

Mahmoud, H. E., El-Far, S. W., & Embaby, A. M. (2021). Cloning, expression, and in silico structural modeling of cholesterol oxidase of *Acinetobacter* sp. strain RAMD in *E. coli*. *FEBS Open Bio*, 11(9), 2560-2575.

Meini, M. R., Llarrull, L. I., & Vila, A. J. (2015). Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo- β -lactamases. *FEBS letters*, 589(22), 3419–3432. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.015>

Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D *et al.*: Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 1996, 84:431-442.

Michalik M, Djahanshiri B, Leo JC, Linke D. Reverse vaccinology: the pathway from genomes and epitope predictions to tailored recombinant vaccines. In: Thomas S, editor. *Vaccine Design. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1403. New York, NY: Humana Press; 2016:87–106. doi:10.1007/978-1-4939-3387-7_4

- Mills CL, Beuning PJ, Ondrechen MJ. Biochemical functional predictions for protein structures of unknown or uncertain function. *Comput Struct Biotechnol J*. 2015; 13:182–191. doi:10.1016/j.csbj.2015.02.003
- Miller SE, Bell CS, McClain MS, Cover TL, Giorgio TD. Dynamic computational model of symptomatic bacteremia to inform bacterial separation treatment requirements. *PLoS One*. 2016;11(9): e0163167. doi: 10.1371/journal.pone.0163167
- Moganty, R. R., Vashistt, J., Tiwari, V., & Kapil, A. (2011). Differential expression of Outer membrane proteins in early stages of meropenem-resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Integrated OMICS*, 1(2), 281-287.
- Mohammad Hamidian, Ruth M. Hall, ISAb1 targets a specific position upstream of the intrinsic ampC gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 68, Issue 11, November 2013, Pages 2682–2683, <https://doi.org/10.1093/jac/dkt233>
- Mostachio, A. K., Levin, A. S., Rizek, C., Rossi, F., Zerbini, J., & Costa, S. F. (2012). High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *International journal of antimicrobial agents*, 39(5), 396-401.
- Motamedi H, Alvandi A, Fathollahi M, Ari MM, Moradi S, *et al.* (2023) *In silico* designing and immunoinformatics analysis of a novel peptide vaccine against metallo-beta-lactamase (VIM and IMP) variants. *PLOS ONE* 18(7): e0275237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275237>
- Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4:10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., & Viale, A. M. (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(4), 1432-1440.
- Naveed, M., Jabeen, K., Aziz, T., Mughual, M. S., ul-Hassan, J., Sheraz, M., ... Alasmari, A. F. (2023). Whole proteome analysis of MDR *Klebsiella pneumoniae* to identify mRNA and multiple epitope based vaccine targets against emerging nosocomial and lungs associated infections. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 43(4), 1915–1928. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2293266>
- Naveed, M., Abid, A., Aziz, T. *et al.* Fragment optimized chalcone derivatives targeting OmpA protein as a therapeutic approach against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* 15, 3917 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-88191-1>
- Nielsen, M., Andreatta, M. NetMHCpan-3.0: predicción mejorada de la unión a moléculas del MHC de clase I mediante la integración de información de múltiples conjuntos de datos de longitud de receptores y péptidos. *Genome Med* 8, 33 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0288-x>

- Nikaido, H., & Pagès, J. M. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 340–363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x>
- Nora, L. C.; Westmann, C. A.; Martins-Santana, L.; Alves, L. d. F.; Monteiro, L. M. O.; Guazzaroni, M.-E.; Silva-Rocha, R. (2019) The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12 (1), 125– 147, DOI: 10.1111/1751-7915.13318
- Olias, P., Etheridge, R. D., Zhang, Y., Holtzman, M. J., & Sibley, L. D. (2016). Toxoplasma effector recruits the Mi-2/NuRD complex to repress STAT1 transcription and block IFN- γ -dependent gene expression. *Cell host & microbe*, 20(1), 72-82.
- Palumbo M. C., A. A. de Graaf, M. Morettini, P. Tieri, S. Krishnan, and F. Castiglione. "A computational model of the effects of macronutrients absorption and physical exercise on hormonal regulation and metabolic homeostasis". In: *Computers in Biology and Medicine* 163 (Sept. 2023). DOI: 10.1016/j.compbio.2023.107158.
- Palzkill, T. (2013). Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1277: 91–104.
- Pappalardo F, Fichera E, Paparone N, Lombardo A, Pennisi M, Russo G, *et al.* *Bioinformatics*. 2016; 32:2672–80
- Patel, B. (2009). Simple, Fast, and Efficient Cloning of PCR Products with TOPO® Cloning Vectors. *BioTechniques*, 46(7), 559. doi:10.2144/000113200
- Peleg, A., H. Seifert, and D. Paterson. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538–582.
- Perez, F., A.M. Hujer, K.M. Hujer, B.K. Decker, P.N. Rather, and R.A. Bonomo. 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3471– 3484.
- Pérez-Llarena, F. J., & Bou, G. (2016). Proteomics As a Tool for Studying Bacterial Virulence and Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology*, 7, 410. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00410>
- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002>
- Poirel, Laurent, Thierry Naas, and Patrice Nordmann. "Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54.1 (2010): 24-38.
- Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. (2020). Molecular characterization of antibiotic-inactivating enzymes in multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 836–845. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz523>
- Prashanth, K., and S. Badrinath. 2005. Epidemiological investigation of nosocomial *Acinetobacter* infections using arbitrarily primed PCR and pulse field gel electrophoresis. *Indian J. Med. Res.* 122:408– 418.

- Preston , A. (2003). Choosing a Cloning Vector. In: Casali, N., Preston, A. (eds) *E. coli* Plasmid Vectors. Methods in Molecular Biology™, vol 235. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:19>
- Pritam M, Singh G, Swaroop S, Singh AK, Singh SP. Exploitation of reverse vaccinology and immunoinformatics as promising plat form for genome-wide screening of new effective vaccine candi dates against Plasmodium falciparum. BMC Bioinformatics. 2019; 19:468. doi:10.1186/s12859-018-2482-x
- Qiu X, Duvvuri VR, Bahl J. Computational approaches and challenges to developing universal influenza vaccines. Vaccines (Basel). 2019;7(2):45. doi:10.3390/vaccines7020045.
- Queenan, A.M. and Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile betalactamases. Clin. Microbiol. Rev. 20(3):440–458.
- Rathinavelu, S., Y. Zavros, and J.L. Merchant. 2003. Acinetobacter lwoffii infection and gastritis. Microbes Infect. 5:651–657.
- Raeven R, van Riet E, Meiring HD, Metz B, Kersten G. Systems vaccinology and big data in the vaccine development chain. Immunology. 2019;156(1):33–46. doi:10.1111/imm.13012
- Raoufi, E., Hemmati, M., Eftekhari, S. *et al.* Epitope Prediction by Novel Immunoinformatics Approach: A State-of-the-art Review. *Int J Pept Res Ther* **26**, 1155–1163 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09918-z>
- Rapin N, Lund O, Bernaschi M, Castiglione F (2010) Computational Immunology Meets Bioinformatics: The Use of Prediction Tools for Molecular Binding in the Simulation of the Immune System. PLOS ONE 5(4): e9862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009862>
- Rasooli, I., Abdolhamidi, R., Jahangiri, A., & Darvish Alipour Astaneh, S. (2020). Outer membrane protein, Oma87 prevents Acinetobacter baumannii infection. International journal of peptide research and therapeutics, 26(4), 2653-2660.
- Rodriguez, R. L., & Denhardt, D. T. (Eds.). (2014). *Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses*. Butterworth-Heinemann.
- Rolain JM, Parola P, Cornaglia G (2010) New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? Clin Microbiol Infect 16: 1699–1701.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2020). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. Frontiers in Microbiology, 11, 548. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.0054>
- Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C (2008) The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect 14(Suppl. 1):33–41
- Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J. A., Soares, N. C., ... & Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55(7), 3084-3090.

- Salahuddin, P.; Kumar, A. and Khan, A.U. (2018). Structure, function of serine and metallo- β -lactamases and their inhibitors. *Curr. Prot. Pepti. Sci.*19: 1-16.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Savov, E., D. Chankova, R. Vatcheva, and N. Dinev. 2002. In vitro investigation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens to ampicillin/sulbactam alone and in combination with amikacin. *Int J. Antimicrob. Agents*. 20:390–392
- Shahid M, Singh A, Sobia F *et al* (2011) An overview of CTX-M β -lactamases. *Rev Med Microbiol* 22:28–40
- Shahinaz M. Abady, Khaled M. Ghanem, Nevine B. Ghanem, Amira M. Embaby, (2021). Molecular cloning, heterologous expression, and in silico sequence analysis of *Enterobacter* GH19 class I chitinase (chiRAM gene), *Molecular Biology Reports*, 10.1007/s11033-021-06914-9, 49, 2, (951-969)
- Sharkey, Liam & O'Neill, Alex. (2019). Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance – Part II. <https://doi.org/10.1002/9781119593522.ch2>.
- Siroy, A., Molle, V., Lemaître-Guillier, C., Vallenet, D., Pestel-Caron, M., Cozzzone, A. J., ... & Dé, E. (2005). Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(12), 4876-4883.
- Siroy, A., Molle, V., Lemaître-Guillier, C., Vallenet, D., Pestel-Caron, M., Cozzzone, A. J., & Daffé, M. (2015). Outer membrane permeability and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Proteome Research*, 14(2), 857-868. <https://doi.org/10.1021/pr5010896>
- Streips UN, Yasbin RE. *Modern microbial genetics*, New York: Wiley-Liss; 2002.
- Soria - Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, RosalesMendoza S. *J Biomed Inform*. 2015;53:405–14. 26.
- Southon, S. B., Beres, S. B., Kachroo, P., Saavedra, M. O., Erlendsdóttir, H., Haraldsson, G., Yerramilli, P., Pruitt, L., Zhu, L., Musser, J. M., & Kristinsson, K. G. (2020). Population Genomic Molecular Epidemiological Study of Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes* in Iceland, 1995 to 2016: Identification of a Large Clonal Population with a pbp2x Mutation Conferring Reduced In Vitro β -Lactam Susceptibility. *Journal of clinical microbiology*, 58(9), e00638-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00638-20>
- Souriau, C., & Hudson, P. J. (2003). Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(2), 305–318. <https://doi.org/10.1517/14712598.3.2.305>
- Srinivasan, V. B., Vaidyanathan, V., & Rajamohan, G. (2015). AbuO, a TolC-like outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*, is involved in antimicrobial and oxidative stress resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(2), 1236-1245.

- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... & Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 18(3), 318-327.
- Terpe, K. (2020). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 81-92. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10264>
- Thomas, C. M., and Frost, L. S. 2014. Plasmid Genomes, Introduction to. *Molecular Life Sciences*, 120. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6436-5_107-2
- Utesch T, de Miguel Catalina A, Schattenberg C, *et al.* A computational modeling approach predicts interaction of the antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* with fungal membranes via its γ -core motif. *mSphere*. 2018;3(5): e00377–18. doi:10.1128/mSphere.00377-18
- Vashist, J., Tiwari, V., Kapil, A., & Rajeswari, M. R. (2010). Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of β -lactam resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of proteome research*, 9(2), 1121-1128.
- Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S. G., Juárez Vignon-Whaley, J. J., Abello Vaamonde, J. A., Padró Alonzo, L. A., Rivera Reséndiz, A., Muleiro Álvarez, M., Vega López, E.N., Franyuti-Kelly, G., Álvarez-Hernández, D. A., Moncaleano Guzmán, V., Juárez Bañuelos, J. E., Marcos Felix, J., González Barrios, J. A., & Barrientos Fortes, T. (2020). *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 205. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040205>
- Vila, J., S. Marti, and J. Sanchez-Cedespes. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:1210–1215.
- Vila, J., & Martínez, J. L. (2018). Enzymatic inactivation of antibiotics in *Acinetobacter baumannii*: A growing threat in hospital settings. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), e01045-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01045-18>
- Vallenet, D., P. Nordmann, V. Barbe, *et al.* 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: Three genomes for three lifestyles. *PLoS One* 3:1805e
- Vanbroekhoven, K., A. Ryngaert, P. Wattiau, R. Demot, and D. Springael. 2004. *Acinetobacter* diversity in environmental samples by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50:37–50.
- Wan-Jiang Zhang, Zongji Lu, Stefan Schwarz, Rong-Min Zhang, Xiu-Mei Wang, Wei Si, Shenye Yu, Liping Chen, Siguo Liu, Complete sequence of the bla_{NDM-1}-carrying plasmid p_{NDM-AB} from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 68, Issue 7, July 2013, Pages 1681–1682, <https://doi.org/10.1093/jac/dkt066>
- Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ (1999) Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol* 3: 614–622.

- Wang Z, Fast W, Benkovic SJ (1999) On the mechanism of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* 38: 10013–10023.
- Wang, T., Yuan, Q., & Ling, B. (2015). Analysis of the expression of the outer membrane protein in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2295-2296.
- Wang T, Zhou Y, Zou C, Zhu Z, Zhu J, Lv J, Xie X, Chen L, Niu S, Du H. 2021. Identification of a Novel blaNDM Variant, blaNDM-33, in an *Escherichia coli* Isolate from Hospital Wastewater in China. *mSphere*6: 10.1128/msphere.00776-21.<https://doi.org/10.1128/msphere.00776-21>
- Wang, N., Yu, H., Zhu, Z., Wang, H., Wei, Y., Wang, Q., ... & Teng, Z. (2025). Novel methylthiocarbamate derivatives as NDM-1 inhibitors to combat multidrug-resistant bacterial infection with β -lactams. *Bioorganic Chemistry*, 154, 108104.
- Walkty, A., Karlowsky, J. A., Baxter, M. R., Adam, H. J., Alexander, D., Bay, D. C., Boyd, D., McCracken, M., Mulvey, M. R., & Zhanel, G. G. (2020). Fosfomycin resistance mediated by fos genes remains rare among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered from the urine of patients evaluated at Canadian hospitals (CANWARD, 2007-2017). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 96(3), 114962. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114962>
- Walsh TR, Hall L, MacGowan AP, Bennett PM (1995) Sequence analysis of two chromosomally mediated inducible β -lactamases from *Aeromonas sobria*, strain 163a, one a class D penicillinase, the other an AmpC cephalosporinase. *J Antimicrob Chemother* 36(1):41–52. <https://doi.org/10.1093/jac/36.1.41>
- Walther-Rasmussen J, Høiby N (2006) OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57(3):373–383. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>
- Waglechner, N., Wright, G.D. Antibiotic resistance: it's bad, but why isn't it worse?. *BMC Biol* 15, 84 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0423-1>
- World Health Organization. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics are Urgently Needed; 2017 <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>
- Wu, W.-Y., Gillies, A.R., Hsui, J.F., Contreras, L., Oak, S., Perl, M.B. and Wood, D.W. (2010), Self-cleaving purification tags re-engineered for rapid Topo® cloning. *Biotechnol Progress*, 26: 1205-1212. <https://doi.org/10.1002/btpr.430>
- Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(5):1060–75.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, *et al.* (2009) Characterization of a New Metallo-Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 5046–5054.
- Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications.

- Biotechnology Journal, 7(5), 620-634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>Galleni, M; Lamotte-Brasseur, J; Rossolini, G.M; Spencer, J; Dideberg, O; Frere J-M. group, M.- β -l.w. (2001). Standard numbering scheme for class B β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 45:660–663.
- Yoon, E.-J., Courvalin, P., & Grillot-Courvalin, C. (2015). Role of the AdeABC efflux pump in intrinsic resistance and membrane permeability in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(10), 6250-6255. <https://doi.org/10.1128/AAC.00537-15>
- Yoon EJ, Jeong SH (2020) Class D β -lactamases. J Antimicrob Chemother 76(4):836–864. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa513>
- Yun, S. H., Choi, C. W., Park, S. H., Lee, J. C., Leem, S. H., Choi, J. S., ... & Kim, S. I. (2008). Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Acinetobacter baumannii* DU202 in tetracycline stress condition. The Journal of Microbiology, 46(6), 720-727.
- 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*. Journal of molecular biology, 427(14), 2329-2339.
- Zhiyong Zong, Xingzhuo Zhang, blaNDM-1-carrying *Acinetobacter johnsonii* detected in hospital sewage, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 68, Issue 5, May 2013, Pages 1007–1010, <https://doi.org/10.1093/jac/dks505>
- Zhou, M. Y., & Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current issues in molecular biology*, 2(1), 1-7.
- Zhou Zhenwen, GuanRuili, YangYiyu, ChenLing, FuJie, DengQiulian, XieYongqiang, HuangYong, WangJielin, WangDaowen, LiaoCan, GongSitang, and XiaHuimin. 2012. Identification of New Delhi metallo- β -lactamase gene (NDM-1) from a clinical isolate of *Acinetobacter junii* in China. Canadian Journal of Microbiology. 58(1): 112-115. <https://doi.org/10.1139/w11-112>