



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A  
LOS ANTIBIÓTICOS EN *Acinetobacter* spp. DEL HOSPITAL  
REGIONAL I.S.S.S.T.E. PUEBLA”.**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA.**

**PRESENTA:**

Q.B.C. RAMÓN RICARDO VERDUGO YOCUPICIO

**ASESORA DE TESIS:**

D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

**PUEBLA, PUE., MÉXICO.**

**NOVIEMBRE 2020**

Puebla, Pue. a 12 de noviembre 2020

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

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Ramón Ricardo Verdugo Yocupicio**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Determinación de mecanismos de resistencia a los antibióticos en *Acinetobacter* spp. del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla"**

A nuestro juicio, el alumno **Ramón Ricardo Verdugo Yocupicio** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

  
D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández

  
D.C. Gerardo Cortés Cortés

  
D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

  
D.C. Claudia F. Martínez de la Peña

## RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

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

Al **Posgrado de Microbiología** del Centro de Investigaciones en en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y seguir creciendo en mi formación.

Este trabajo recibió fondos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a través de la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** proyectos 100031833-VIEP2019.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por otorgar la beca de maestría con el número de becario 912829.

Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP)** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

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

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

Reconocimiento al **Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos**, del Programa de Genómica Evolutiva de Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, y al **Dr. Jesús Silva Sánchez**, del Departamento de Resistencia Bacteriana, del Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México, por la donación de cepas que se usaron como controles en esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain** por todo el apoyo y esfuerzo para dirigir este proyecto con *Acinetobacter*. Le agradezco infinitamente por darme la confianza y permitirme ser parte de su equipo de trabajo y del laboratorio, por todos los regaños, consejos, enseñanzas y momentos inolvidables que me brindó durante mi estancia. Espero haber cumplido con todas sus expectativas y haber dejado mi granito de arena para que el estudio de este bicho tan peculiar continúe.

A la **D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia** muchas gracias por la confianza, motivación, consejos y risas en todo momento, y por dejarme experiencias inolvidables durante mi paso en el laboratorio. De todo corazón ¡muchas gracias!

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

A la **D. C. Claudia Martínez de la Peña** muchas gracias por adentrarme en el mundo de la bioinformática, así como por sus valiosos aportes a este trabajo.

Al **D. C. Gerado Cortés Cortés** por dedicarle tiempo a la revisión de este trabajo y por todos los buenos consejos y enseñanzas que me brindó. Gracias por tu amistad, por las risas y todo el apoyo que me brindaste en todo momento.

A la **D. C. María Elena Bello López** que me introdujo al interesante mundo de este bicho raro, muchas gracias por la paciencia y espíritu de enseñanza que me tuviste, así como tu extraordinario aporte junto con la Dra. Pati en mi formación durante mi estancia en el laboratorio. ¡Infinitas gracias!

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres: **Adelaido y Martha**, esta tesis se la dedico a ustedes porque son los pilares de mi vida y son quienes me han motivado a seguirme preparando. Les agradezco infinitamente por todo el amor y apoyo incondicional que siempre me han dado.

A mis hermanos: **Marthita y Daniel** por su cariño, apoyo y paciencia en todo momento.

A mi **Madrina y a mis tías Jovita, Julieta, Angelita y Lota** por siempre motivarme y darme buenos consejos y consuelo siempre que lo necesitaba. ¡Mil gracias!

A mi abuelita **Doña Chayo**, por todos esos momentos, risas, cariño y consejos que siempre me dió.

A mis amigos y equipo de TaeKwonDo poblanos porque siempre es importante saber que se cuenta con personas tan valiosas como ustedes, muchas gracias por su amistad sincera y extraordinaria.

A mis amigos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad: **Flor, Edwin, Alma, Yessenia, Deysi, Jessi, Eder, Valeria, Cristi, Gerardo, Michelle, Miranda, Marco, René, Mariela, Midory, Brenda y Diana** por su ayuda en el laboratorio y por haber sido excelentes compañeros y amigos durante mi paso; gracias a **Brenda** por el gran equipo de trabajo que formamos para trabajar a nuestros bichos.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1 INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD Y AGENTES CAUSALES</b>	1
<b>1.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Acinetobacter</i></b>	1
<b>1.3 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO</b>	2
<b>1.4 IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>Acinetobacter</i></b>	3
<b>1.5 IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>Acinetobacter</i></b>	3
<b>1.6 PATOGENICIDAD DEL GÉNERO <i>Acinetobacter</i></b>	4
<b>1.7 TRATAMIENTO, CONTROL Y PREVENCIÓN DE INFECCIONES CAUSADAS POR <i>Acinetobacter</i> spp.</b>	5
<b>1.8 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS</b>	6
<b>1.6.1 INACTIVACIÓN O MODIFICACIÓN DEL ANTIBIÓTICO</b>	6
<b>1.6.2 BOMBAS DE EXPULSIÓN</b>	8
<b>1.6.3 CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR</b>	9
<b>1.6.4 ALTERACIÓN O MODIFICACIÓN DE SITIOS BLANCO</b>	10
<b>1.7 ELEMENTOS GENÉTICOS MOVILIZABLES</b>	10
<b>2. ANTECEDENTES</b>	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	12
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	12
<b>4.1 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	13
<b>5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO</b>	13
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
<b>6.1 CEPAS DE ESTUDIO</b>	14
<b>6.1.1 DECLARACIÓN ÉTICA</b>	14
<b>6.1.2 CEPAS CONTROL</b>	15
<b>6.2 TIPIFICACIÓN MOLECULAR POR <i>rpoB</i></b>	15
<b>6.3 MÉTODOS DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS</b>	16
<b>6.3.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER</b>	16
<b>6.3.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN AGAR</b>	17
<b>6.4 DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN EN LA PRESENCIA DE LOS INHIBIDORES DE BOMBAS DE EXPULSIÓN L-FENILALANINA-BETA-NAFTILAMIDA (PABN) Y CARBONIL CIANURO 3-CLOROFENILHRIDRAZONA</b>	18

(CCCP)	
6.5 RELACIÓN CLONAL POR ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)	19
6.6 EXTRACCIÓN DEL TEMPLADO DE ADN POR EL MÉTODO DE LISIS POR CALOR	21
6.7 CUANTIFICACIÓN DE ADN	21
6.8 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA Y SECUENCIAS DE INSERCIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	22
6.9 VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	22
6.10 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	23
6.11 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE PRODUCTOS DE PCR	23
6.12 EXTRACCIÓN DE PLASMÍDOS POR EL MÉTODO DE KIESER (1984)	23
6.13 SECUENCIACIÓN MASIVA DE GENOMA	24
7. RESULTADOS	25
7.1 PROCEDENCIA DE LAS CEPAS	25
7.2 IDENTIFICACIÓN POR EL SISTEMA VITEK® 2	26
7.3 AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN CEPAS DE <i>Acinetobacter</i> spp.	27
7.4 TIPIFICACIÓN MOLECULAR POR <i>rpoB</i> DE ALGUNAS CEPAS AISLADAS	28
7.5 FENOTIPO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LAS CEPAS DE <i>Acinetobacter</i> spp-	30
7.6 GENOTIPO DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE 25 CEPAS <i>A. baumannii</i> MDR	32
7.7 ENTORNOS GENÉTICOS DE LAS BETALACTAMASAS PRESENTES EN CEPAS <i>A. baumannii</i> MDR	33
7.8 RELACIÓN CLONAL DE LAS 25 CEPAS <i>A. baumannii</i> MDR	34
7.9 PERFIL PLASMÍDICO DE 25 CEPAS <i>A. baumannii</i> MDR	35
7.10 PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE EXPULSIÓN EN LA RESISTENCIA A IMIPENEM, MEROPENEM, AMIKACINA Y CIPROFLOXACINO EN 25 CEPAS <i>A. baumannii</i> MDR	36
7.11 SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GENOMA DE LA CEPA <i>A. baumannii</i> AE38	39
7.11.1 TIPIFICACIÓN MULTILOCUS	40
7.11.2 ANÁLISIS DE Ñ RESISTOMA Y ELEMENTOS GENÉTICOS MOVILIZABLES ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN LA CEPA <i>A. BAUMANNII</i> AE38	40
7.11.3 ESTUDIO DEL PLÁSMIDO PORTADOR DE <i>bla</i> <sub>OXA-72</sub> EN LA CEPA AE38	43
8. DISCUSIÓN	45

<b>9. CONCLUSIONES</b>	59
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	59
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	60
<b>ANEXOS</b>	73

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Cepas control	15
2	Oligonucleótidos usados para la tipificación molecular de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp.	16
3	Puntos de corte del CLSI, 2020 para <i>Acinetobacter</i> spp.	17
4	Puntos de corte de CMI para <i>Acinetobacter</i> spp.	18
5	Componentes para la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific) para la amplificación de genes de resistencia y secuencias de inserción	22
6	Participación de bombas de expulsión en 25 cepas <i>A. baumannii</i> MDR	39
7	Comparación de ensamblajes con y sin <i>trimming</i> utilizando la herramienta QUAST	40
8	Datos de la cepa <i>A. baumannii</i> AE38 MDR y resistente a carbapenémicos	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Dendograma que representa la relación filogenética de 13 cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, derivada de la secuenciación parcial del gen <i>rpoB</i> .	29
2	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR	34
3	Dendograma por PFGE- <i>Apal</i> de 24 cepas <i>A. baumannii</i> MDR, aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla	35
4	Extracción plasmídica por el método de Kieser modificado de 25 cepas <i>A. baumannii</i> MDR, aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla	36
5	Representación del integron que porta la cepa AE38	43
6	Representación gráfica de la localización de secuencias promotoras para la expresión de <i>bla</i> <sub>OXA-72</sub> en la cepa <i>A. baumannii</i> AE38	44
7	Representación de la secuencia del plásmido pAbaAE38 y la comparación con los plásmidos pAbaAN71, pAba5845a y pAba10042a portadores de <i>bla</i> <sub>OXA-72</sub>	45

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO	TÍTULO	PÁGINA
1	Porcentaje de cepas de <i>Acinetobacter</i> spp. por origen de la muestra	26
2	Porcentaje de pacientes por servicio hospitalario	26
3	Porcentaje de especies identificadas por el sistema Vitek® 2 de las cepas de <i>Acinetobacter</i> spp.	27
4	Perfil de resistencia a antibióticos de cepas del complejo <i>Acb</i> obtenido por el método de Kirby-Bauer	30
5	Perfil de resistencia a antibióticos de cepas ambientales obtenido por el método de Kirby-Bauer	31
6	Concentración Mínima Inhibitoria de cepas <i>A. baumannii</i> MDR	32
7	Porcentaje de cepas <i>A. baumannii</i> MDR portadoras de genes de betalactamasas determinado por PCR y secuenciación	33

## ABREVIATURAS

<b>Acb</b>	Complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii</i>
<b>AN</b>	Amikacina
<b>BET</b>	Bromuro de Etidio
<b>BLEE</b>	Betalactamasa de Espectro Extendido
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CCCP</b>	Carbonil Cianuro 3-Clorofenilhidrazona
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMA</b>	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>GN</b>	Gentamicina
<b>IPM</b>	Imipenem
<b>LVX</b>	Levofloxacino
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MIO</b>	Medio para evaluar Movilidad-indol-ornitina
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLST</b>	Tipificación multilocus de secuencias ( <i>Multilocus sequence typing</i> )
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NET</b>	Netilmicina
<b>NOR</b>	Norfloxacina
<b>O/F</b>	Prueba de oxidación-fermentación
<b>PAβN</b>	L-Fenilalanina-Arginina-β-Naftilamida
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campos pulsados ( <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> )
<b>PIP</b>	Piperacilina
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>ST</b>	Secuencia tipo
<b>SXT</b>	Trimetoprim/Sulfametoxazol
<b>TE</b>	Tetraciclina
<b>TIC</b>	Ticarcilina
<b>TIM</b>	Ticarcilina/Ácido clavulánico
<b>TSI</b>	Agar hierro y triple azúcar
<b>TZP</b>	Piperacilina/Tazobactam
<b>UCI</b>	Unidad de Cuidados Intensivos
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonia
<b>mg</b>	Miligramo
<b>μL</b>	Microlitro

## RESUMEN

**Introducción:** Dentro del género *Acinetobacter*, las especies pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* son las que se asocian principalmente como causantes de infecciones hospitalarias y de la comunidad, donde *A. baumannii* es la especie más estudiada. Estos microorganismos pueden desarrollar resistencia a los antimicrobianos debido a mecanismos intrínsecos o por la adquisición de ellos, lo cual ha disminuido las alternativas de tratamiento y dificultado la recuperación del paciente, al igual que les ha permitido adaptarse y sobrevivir en el ambiente hospitalario, lo que dificulta su erradicación en este entorno.

**Objetivo:** Determinar algunos mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *Acinetobacter spp.* causantes de infecciones en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla.

**Material y métodos:** Se recolectaron cepas de pacientes hospitalizados y ambulatorios durante el periodo 2015-2019. Fueron identificadas por el sistema Vitek® 2 y algunas cepas fueron tipificadas por la secuenciación parcial del gen *rpoB*. Se realizaron pruebas de susceptibilidad antibiótica (método Kirby-Baüer) y concentración mínima inhibitoria (CMI) en presencia y ausencia de dos inhibidores de bombas de expulsión. Se determinó la relación clonal por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). Por PCR y secuenciación se determinaron genes de resistencia. Se realizó extracción plasmídica y se secuenció el genoma completo de una cepa portadora de carbapenemasas.

**Resultados:** Se trabajó con 49 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla. Un 25% fueron aisladas de lavados broncoalveolares, 14% de expectoraciones, 14% de urocultivos, 10% de secreciones de heridas, entre otros. Provinieron de los servicios de medicina interna y la unidad de cuidados intensivos principalmente. 36 cepas fueron identificadas como pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* por el sistema Vitek® 2, mientras que 13 se trataron de cepas consideradas especies ambientales: 7 *A. haemolyticus*, 3 *A. lwoffii*, 2 *A. ursingii* y 1 *Acinetobacter spp.* Sólo 13 cepas fueron tipificadas por la secuenciación parcial del gen *rpoB*: 7 *A. baumannii*, 1 *A. pittii*, 3 *A. haemolyticus*, 1 *A. ursingii* y 1 *A. schindleri*. De acuerdo con el perfil de susceptibilidad antibiótica fueron seleccionadas 25 cepas *A. baumannii* multidrogo-resistentes (MDR) y resistentes a carbapenémicos. Las 25 cepas *A. baumannii* MDR no formaron parte de un brote y se distribuyeron en 7 pulsotipos diferentes, fueron portadoras de las betalactamasas OXA-66 (100%), OXA-72 (100%), OXA-23-like (12%), NDM-like (36%) e IMP-like (4%). Se localizaron los arreglos IS*Aba48* río arriba de OXA-72 en 21 cepas, y el arreglo IS*Aba125* río arriba de NDM-like en 9 cepas. Se observaron 4 perfiles de bandas plasmídicas diferentes en las 25 cepas *A. baumannii* MDR. Se evidenció la participación de bombas de expulsión de familias diferentes en la resistencia a carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. La cepa *A. baumannii* AE38 porta diversos determinantes de resistencia, así como un plásmido que alberga a OXA-72 (pAbaAE38) y se logró localizar a IS*Aba48* río arriba conformando un segundo promotor a la betalactamasa. En la misma cepa fueron localizados múltiples sistemas de expulsión de diferentes familias, incluyendo los 3 principales de la familia RND (*resistance-nodulation-division family*). No se encontró al sistema regulador AdeRS del sistema AdeABC, se

encontraron cambios aminoacídicos en los componentes AdeB y AdeJ, así como en el regulador AdeN del sistema AdeIJK.

**Conclusión:** Se mostró la presencia de aislados *A. baumannii* MDR causantes de infecciones en este hospital. Se encontraron aislados portadores de carbapenemasas tipo OXA, NDM-like, e IMP-like. Se mostró que las bombas de expulsión juegan un papel importante en la resistencia a los antibióticos. Estos mecanismos contribuyen a la adaptación de *A. baumannii* en al ambiente hospitalario.

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

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud y agentes causales

Las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) son un importante problema de salud pública que contribuye sustancialmente a un incremento del tiempo de hospitalización, costos de atención, así como a la morbilidad y mortalidad causando un gran impacto socioeconómico (Hopmans *et al.*, 2020; Sosa-Hernández *et al.*, 2019). Las IAAS se presentan principalmente en unidades de cuidados intensivos (UCI), no obstante, también pueden presentarse en pacientes ambulatorios, esto debido a diversas patologías de base y asociadas a múltiples tratamientos que incluyen antibióticos, los cuales propician un ambiente hostil y al cual los microorganismos deben adaptarse para sobrevivir en él (Salmanov *et al.*, 2019).

Dentro de los microorganismos causantes de estas infecciones, el grupo ESCAPE (conformado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterias) ha adquirido mayor relevancia debido a que los géneros bacterianos que lo constituyen tienen la habilidad de “escapar” de la acción biocida de los antibióticos, y están causando dificultades en el tratamiento y recuperación de los pacientes (Peterson, 2009; Mulani *et al.*, 2019). Sin embargo, aunque en la actualidad, este grupo de bacterias es más frecuentemente aislado, no se debe dejar de lado a otros microorganismos importantes causantes de infecciones como lo son *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* (RHOVE, 2015).

## 1.2 Taxonomía del género *Acinetobacter*

Exactamente no se conoce cuando se realizó el primer aislamiento de alguna especie del género, pero se estima que durante 1914 se aislaron a los primeros coccobacilos Gramnegativos que probablemente se trataban de *Acinetobacter* spp. (Wong *et al.*, 2017). A la fecha, los nombres de las diferentes especies han sufrido

cambios taxonómicos a lo largo de los años, se les llegó a nombrar como *Mima polymorpha* (ahora *Acinetobacter lwoffii*), *Herellea vaginicola* (ahora *Acinetobacter baumannii* o *Acinetobacter calcoaceticus*), *Bacterium anitratum* y *Moraxella lwoffii*; sin embargo, la clasificación taxonómica actual del género *Acinetobacter* pertenece al dominio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales* y familia *Moraxellaceae* (Almasaudi *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2017). De acuerdo con la clasificación de Alexandr Nemeč, el género consiste en 63 especies distintas con nombres validados, 10 nuevas especies putativas, pero no válidamente nombradas, y 17 cepas en un estado taxonómico aún desconocido (<https://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>, la última actualización se realizó en enero del 2020).

### 1.3 Características del género

El género *Acinetobacter* consta de cocobacilos Gramnegativos, no móviles, no esporulados, catalasa positivos y oxidasa negativos, la mayoría de los aislamientos no fermentan la glucosa y su genoma tiene un contenido G+C del 39% (Lee *et al.*, 2017). A pesar de ser inmóviles se ha reportado que en medios semisólidos llegan a presentar un movimiento tipo *twitching* mediado por pili tipo IV (Doughari *et al.*, 2009).

*Acinetobacter* spp. se encuentra ampliamente distribuido en diferentes ambientes incluyendo suelo, agua, vegetales y piel de animales y humanos. En el humano ha sido aislado de diferentes sitios anatómicos como nariz, oídos, garganta, frente, tráquea, conjuntiva, vagina, axila y manos (Maravic *et al.*, 2016). De igual manera puede sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en superficies y objetos inanimados y además de ser resistente a la desecación (Asif *et al.*, 2018).

### 1.4 Importancia del género *Acinetobacter*

Dentro de las especies conformantes de este género, las especies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (especie genómica 3), *A. nosocomialis* (especie genómica 13TU), *A. seifertii* y *A. dijkshoorniae* en conjunto forman el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (*Acb*) (Nemeč *et*

*al.*, 2011; Nemec *et al.*, 2015; Cosgaya *et al.*, 2016). Por el alto grado de similitud entre estas especies, el término complejo *Acb* fue acuñado para incluirlas (Gerner-Smidt *et al.*, 1991; Nemec *et al.*, 2011; Cosgaya *et al.*, 2016; Nemec *et al.*, 2019).

El complejo *Acb* es el principal causante de múltiples infecciones en el tracto respiratorio, tracto urinario, torrente sanguíneo, piel, tejidos blandos, entre otros más (Facciola *et al.*, 2019). *A. baumannii* es la especie más frecuentemente aislada como causante de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad, seguido de *A. pittii* y *A. nosocomialis*. Estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar piel y superficies inertes, y actualmente presentan resistencia a gran variedad de antibióticos, lo que en conjunto les permite sobrevivir en el ambiente hospitalario (Bello-López *et al.*, 2019; Villalón *et al.*, 2019; Gaiarsa *et al.*, 2019).

### **1.5 Identificación del género *Acinetobacter***

Las especies del complejo *Acb* pueden crecer adecuadamente entre 35-37°C, mientras que *A. baumannii* es la única especie del género que puede crecer a 44°C. Puede aislarse en medios de cultivo rutinarios de laboratorio como agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey. En este último se producen colonias incoloras indicando la incapacidad para fermentar lactosa, mientras que en el agar selectivo Leeds (Jawad *et al.*, 1994), *Acinetobacter* muestran colonias color rosado (Muhammad *et al.*, 2018). Entre las pruebas fenotípicas que se utilizan para la identificación del género se encuentran pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, producción de indol, prueba de movilidad, oxidación de glucosa, crecimiento a 44°C, hidrólisis de gelatina y asimilación de múltiples fuentes de carbono (Peleg *et al.*, 2008). En los hospitales se emplean sistemas semiautomatizados como API® 20NE, VITEK® 2 y Microscan®, que se basan en el metabolismo bacteriano para la diferenciación de especies de este género.

Si bien, se han utilizado diferentes métodos fenotípicos y genotípicos para la identificación de especies del género *Acinetobacter*, el problema radica en que incluye un gran número de especies nombradas, pero no hay una técnica simple

para su adecuada identificación (Mateo-Estrada *et al.*, 2019). Se han desarrollado diferentes metodologías moleculares para la identificación a nivel especie, donde la espectrofotometría de masas MALDI-TOF es recientemente el método de elección para la identificación rápida de especies bacterianas. Sin embargo, no puede diferenciar de manera confiable entre algunas especies estrechamente relacionadas como las pertenecientes al complejo *Acb* (Šedo *et al.*, 2013; Fernández-Orth *et al.*, 2017). Otras técnicas empleadas son hibridación ADN-ADN, y el uso de diferentes marcadores filogenéticos como el 16S rRNA, *recA* (Krawczyk *et al.*, 2002), *gyrB* (Teixeira *et al.*, 2017) y *rpoB*. La amplificación de una región específica ( $\approx 350$  pb) del gen *rpoB* (que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa bacteriana) es la técnica más utilizada para la tipificación de aislados de *Acinetobacter* spp. (La Scola *et al.*, 2006). Y actualmente es más común la utilización de la secuenciación masiva del genoma completo en conjunto con la metodología de identidad de nucleótidos promedio (ANI) (Nemec *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019).

### **1.6 Patogenicidad del género *Acinetobacter***

Las especies del género *Acinetobacter* son consideradas como patógenos oportunistas (Lee *et al.*, 2017). Recientes estudios han identificado pocos factores de virulencia en comparación con otros patógenos Gramnegativos (McConnell *et al.*, 2013). Dentro los factores de virulencia que han sido estudiados en *A. baumannii* se encuentran la producción de proteínas de membrana externa como OmpA y Omp33-36 que juegan un papel importante en la adherencia e invasión celular (Smani *et al.*, 2013; Smani *et al.*, 2014); la síntesis de cápsula lipopolisacárida que incrementa la resistencia al complemento (Geisinger *et al.*, 2015); la producción de sistemas de captación de metales como las acinetobactinas que contribuyen a la patogenicidad de *A. baumannii* en infecciones (McConnell *et al.*, 2013); así como la expresión de sistemas de secreción tipo II, V y VI que participan en el transporte e inyección de proteínas efectoras y en la formación de biopelícula (Weber *et al.*, 2016).

## **1.7 Tratamiento, control y prevención de infecciones causadas por *Acinetobacter* spp**

Dependiendo de la resistencia a los antibióticos que presentan los aislados de *Acinetobacter* spp., se clasifican en: cepas multidrogo-resistentes (MDR) cuando no son susceptibles a uno o más antibióticos en tres categorías antibióticas diferentes, extremadamente resistentes (XDR) cuando no presentan susceptibilidad a uno o más antibióticos en todas las categorías, excepto en dos o menos categorías antibióticas diferentes. Y, por último, pandrogo-resistentes (PDR) cuando no presentan susceptibilidad a ninguno de los antibióticos empleados (Magiorakos *et al.*, 2012).

El tratamiento empírico inadecuado de las infecciones graves causadas por *A. baumannii* se asocia con un aumento en la mortalidad. Por lo tanto, es crucial conocer las opciones terapéuticas disponibles, así como el perfil de susceptibilidad de cada caso en particular (Garnacho *et al.*, 2019). Si bien, los carbapenémicos siguen siendo el tratamiento de elección para cepas de *Acinetobacter* MDR, actualmente el reporte de *Acinetobacter* resistentes a carbapenémicos ha ido en aumento a nivel mundial (Akrami *et al.*, 2019). Es por ello, que se buscan otras opciones terapéuticas como el empleo de la combinación ampicilina/sulbactam la cual ha sido efectiva en el tratamiento de algunos casos de infecciones por *Acinetobacter* resistentes a carbapenémicos. Para infecciones causadas por cepas PDR se opta por utilizar combinaciones de antibióticos como colistina/carbapenémicos, colistina/tigeciclina o colistina/aminoglucósido, pero desafortunadamente, la toxicidad de estas opciones ha hecho que sean de última opción (Garnacho *et al.*, 2019).

Una característica importante de *A. baumannii* es su habilidad para causar brotes y volverse endémico, es necesaria la implementación de estrategias de control y prevención de infecciones, tales como el aislamiento del paciente, la limpieza y cuidado de dispositivos invasivos, la higiene tanto del personal sanitario como de las instalaciones hospitalarias, y por último, y más importante, el constante y

adecuado lavado de manos antes, durante y después de tratar al paciente (Garnacho *et al.*, 2015).

## **1.8 Mecanismos de resistencia a los antibióticos**

*Acinetobacter baumannii* se ha convertido en uno de los patógenos con mayor interés médico y de investigación debido a su asombrosa capacidad para persistir y adaptarse a diferentes ambientes (Lin *et al.*, 2014). En los 1970's las infecciones por *Acinetobacter* podrían tratarse eficazmente con antibióticos de primera línea como penicilinas, sin embargo, se comenzó a observar un incremento en la ineficacia de este grupo y otros más para tratar dichas infecciones (González-Villoria *et al.*, 2016). Aunque este microorganismo posee en su genoma central resistencia innata hacia algunos grupos de antibióticos, también fácilmente puede adquirir nuevos determinantes de resistencia, los cuales al acumularse han disminuido gradualmente las opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones en la práctica clínica (Lee *et al.*, 2017; Garnacho *et al.*, 2019).

Dentro de los mecanismos de resistencia a los antibióticos que han sido descritos y estudiados están la inactivación o modificación del antibiótico, participación de sistemas de bombas de eflujo que expulsan al antibiótico, reducción en la permeabilidad de la membrana celular y alteración o protección de los sitios blanco sobre los que actúan los antibióticos. Estas son diferentes estrategias que han sido adquiridas por *Acinetobacter* para evadir la acción de estos agentes antimicrobianos (Mulani *et al.*, 2019).

### **1.8.1 Inactivación o modificación del antibiótico**

La inactivación enzimática por betalactamasas es el mecanismo más importante y ampliamente distribuido en *Acinetobacter* spp. De acuerdo con la homología en las secuencias aminoacídicas de estas enzimas, se pueden agrupar en diferentes clases, A, B, C y D (Bush *et al.*, 2020). En *A. baumannii* las 4 clases de betalactamasas han sido identificadas y estudiadas (Kaur *et al.*, 2018).

Betalactamasas de clase A como TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, SCO y CARB han sido identificadas en *A. baumannii*, cabe mencionar que esta clase de betalactamasas hidrolizan eficazmente penicilinas y cefalosporinas, además de que pueden ser inhibidas empleando ácido clavulánico. Dentro de este mismo grupo algunas variantes de GES y KPC con actividad carbapenemasa han sido detectadas en aislados de *A. baumannii* (Lee *et al.*, 2017).

A diferencia de betalactamasas de clase A, C y D cuya actividad enzimática depende de residuos de serina, las de clase B o también denominadas metalo-betalactamasas emplean Zinc para su actividad catalítica (Jeon *et al.*, 2015). Esta clase de enzimas confieren resistencia a todos los antibióticos betalactámicos, incluyendo carbapenémicos, con excepción de monobactámicos (Ramírez *et al.*, 2020). En *A. baumannii* se han identificado la metalo-betalactamasa NDM y sus variantes NDM-1, NDM-2, NDM-3, NDM-5 y NDM-7 (Wu *et al.*, 2019; Khalid *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020); del grupo VIM las variantes VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-6, VIM-11 y VIM-25 (Ramírez *et al.*, 2020); y del grupo IMP las variantes IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8, IMP-11, IMP-14, IMP-19, IMP-24 e IMP-55 han sido reportadas en este microorganismo (Lee *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2020).

*Acinetobacter* spp. acarrea una betalactamasa de clase C intrínseca derivada de AmpC, la cual es denominada como ADC (*Acinetobacter* derived cephalosporinase) (Périchon *et al.*, 2014). Esta enzima puede conferir resistencia a cefamicinas, penicilinas, cefalosporinas e inhibidores de betalactamasas (Karah *et al.*, 2017).

Dentro de este género, las betalactamasas de clase D o también denominadas oxacilinasas (OXA), por su capacidad de hidrolizar más rápidamente oxacilina que bencilpenicilinas, se encuentran ampliamente distribuidas en las diferentes especies de *Acinetobacter* (Jeon *et al.*, 2015). Esta clase de enzimas pueden dividirse en diferentes familias o subgrupos de acuerdo con su secuencia aminoacídica, donde las que tienen mayor relevancia en *A. baumannii* son aquellas familias que presentan actividad carbapenemasa como OXA-51-like, OXA-23-like, OXA24/40 like y OXA-58-like (Evans *et al.*, 2014).

Otras enzimas importantes son las enzimas modificadoras de aminoglucósidos responsables, en parte, de la resistencia de *A. baumannii* hacia aminoglucósidos como acetiltransferasas (AACC1, AACC2 y AACA4), adeniltransferasas (ANT(3'')-la) y fosfotransferasas (APHA1 y APH(3'')). Los genes que codifican para estas enzimas son comúnmente encontrados en elementos genéticos movilizables como integrones (In) y transposones (Tn) los cuales a su vez pueden localizarse en plásmidos o en el cromosoma de la bacteria formando parte o no de islas genómicas de resistencia (Lee *et al.*, 2017).

### 1.8.2 Bombas de expulsión

En diferentes bacterias Gramnegativas los sistemas de eflujo juegan un papel muy importante en el surgimiento de cepas MDR. Seis familias de bombas de expulsión han sido descritas en *A. baumannii*: *ATP binding cassette (ABC) transporters*, *major facilitation super family (MFS)*, *multidrug toxic composite extrusion (MATE) transporters*, *small drug resistance (SMR) family*, *resistance-nodulation-division (RND) family* y la más recientemente descrita *proteobacterial antimicrobial composite efflux (PACE) family* (Temgoua *et al.*, 2018). Particularmente la sobreexpresión de sistemas de eflujo de la familia RND, como AdeABC, AdeFGH y AdeIJK se han asociado con heteroresistencia en *A. baumannii* esto debido al amplio espectro de grupos de antibióticos que pueden expulsar (Leus *et al.*, 2018).

La sobreexpresión del sistema AdeABC puede conferirle resistencia a la mayoría de los antibióticos que se emplean como tratamiento en las infecciones causadas por este microorganismo como lo son betalactámicos, incluyendo carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, tigeciclina, cloranfenicol y trimetoprim. De igual manera, en el caso de AdeIJK se asocia con resistencia a betalactámicos, incluyendo carbapenémicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, trimetoprim, cloranfenicol y sulfonamidas. Mientras que la sobreexpresión de AdeFGH se asocia principalmente con la expulsión de aminoglucósidos, fluoroquinolonas y cloranfenicol (Mullie *et al.*, 2016; Leus *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019). Asimismo, la sobreexpresión de otros sistemas de la familia RND como AdeDE y AdeXYZ han

sido reportados e involucrados en la resistencia a carbapenémicos en *A. pittii* y *A. nosocomialis* (Singkham *et al.*, 2018).

Para combatir la resistencia antibiótica dada por estas bombas podrían emplearse inhibidores de bombas de eflujo, los cuales pueden restaurar la acción biocida del antibiótico. Los mecanismos específicos implicados en la inhibición aún no son comprendidos en su totalidad, no obstante, las bombas de eflujo pueden ser inhibidas a nivel de su actividad, de su expresión o de su ensamblaje (Blanco *et al.*, 2018). La Fenilalanina-Arginina-Beta-Naftilamida (PA $\beta$ N) es un inhibidor competitivo para los sistemas de eflujo de la familia RND, el cual se une al sitio de reconocimiento del antibiótico en la bomba de eflujo y de esta manera favorece la acumulación y acción del agente antimicrobiano (Mullie *et al.*, 2016; Lamut *et al.*, 2019). Mientras que otros inhibidores, como el Carbonil Cianuro 3-Clorofenilhidrazona (CCCP), actúa inhibiendo el gradiente de protones de la bomba de eflujo; y no solamente inhibe a sistemas de la familia RND sino también a otras familias que emplean la misma fuente energética como son MATE, SMR y MFS (Reza *et al.*, 2019).

### **1.8.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana celular**

En *A. baumannii* las porinas forman canales que permiten el transporte de moléculas a través de la membrana externa y es por lo mismo que estas estructuras pueden jugar un papel importante en la resistencia antibiótica. Interrupciones o deleciones en la porina CarO o por presencia de secuencias de inserción como IS*Aba1*, IS*Aba10*, IS*Aba825* O IS*Aba15* se asocian con un aumento en los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para carbapenémicos (Mirshekar *et al.*, 2018). No obstante, otras porinas como OmpA, Omp22-33, Omp33-36, Omp37, Omp43, Omp44 y Omp47 podrían estar participando en la resistencia a antibióticos, debido a una interacción entre estas estructuras y carbapenemasas como OXA-23 (Fonseca *et al.*, 2013; Smani *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017).

### **1.8.4 Alteración o modificación de sitios blanco**

El principal mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas es mediado por mutaciones en GyrA (Ser83Leu, Gly81Val, Ala84Pro y Gly81Asp) y ParC (Ser80Leu, Glu84Lys, Gly78Cys), subunidades de la DNA girasa y topoisomerasa IV respectivamente (Yoon *et al.*, 2013; Ugolotti *et al.*, 2016).

Por otro lado, también han sido identificados en *A. baumannii* determinantes de resistencia a quinolonas codificadas en plásmidos como son *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* (Yang *et al.*, 2016). Otros mecanismos son la sobreexpresión de proteínas de unión a penicilina (PBP) alteradas y con baja afinidad a imipenem las cuales están involucradas con la resistencia a este antibiótico (Lee *et al.*, 2017). También está la metilación de la subunidad 16S de rRNA por *armA* y protección ribosomal por *tetM* que son responsables de resistencia a aminoglucósidos y tetraciclinas en *A. baumannii* (Hasani *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

### **1.9 Elementos genéticos movilizables**

En la actualidad existe un incremento en los reportes de cepas MDR, XDR y PDR en especies de *Acinetobacter* (Garza-González *et al.*, 2019; López-Durán *et al.*, 2020). El desarrollo de estos fenotipos de resistencia, frecuentemente, se deben a eventos de transferencia horizontal de genes de resistencia entre especies de este u otros géneros bacterianos (Pagano *et al.*, 2016). Estos genes de resistencia pueden localizarse dentro de elementos genéticos movilizables como lo son integrones, transposones o secuencias de inserción (ISAba), que a su vez pueden encontrarse integrados en material genético extracromosomal denominados plásmidos (Brovedan *et al.*, 2020). Actualmente existe un esquema de tipificación de plásmidos de *Acinetobacter* basado en su replicón (Bertini *et al.*, 2010); sin embargo, no todos los plásmidos que portan las especies de este género pueden ser clasificados por esta metodología, por lo que es necesario estudiar más los plásmidos en este género bacteriano, para poder establecer alguna herramienta de clasificación.

## 2. ANTECEDENTES

Las IAAS y la resistencia a los antibióticos se han convertido en amenazas en crecimiento para la salud pública en todo el mundo (Tacconelli *et al.*, 2018). En Europa estas problemáticas son vigiladas por el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC) en conjunto con la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana (EARS). En su reporte anual epidemiológico en 2017, reportaron que un 64% de los aislados de *A. baumannii* presentaron resistencia a antibióticos carbapenémicos. Por el contrario, en Estados Unidos el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en el mismo periodo reportó una disminución en los casos de IAAS por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (de 11,700 casos en 2013 contra 8,500 casos en 2017), no obstante, la producción de carbapenemasas en esta bacteria sigue siendo motivo de preocupación para las autoridades sanitarias debido a una posible diseminación a otros géneros bacterianos y en consecuencia un incremento en el problema de la resistencia antimicrobiana (CDC 2019). En México la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica en su informe anual de 2015 reportó a *Acinetobacter baumannii* como principal agente causal aislado en brotes de IAAS.

En México, son pocos los grupos de trabajo que han realizado estudios sobre mecanismos de resistencia en *Acinetobacter* spp., los cuales han sido focalizados sólo en ciertos lugares de nuestro país. Estos estudios se han centrado principalmente en la especie *A. baumannii* y búsqueda de carbapenemasas, encontrando la prevalencia de genes de betalactamasas tipo OXA como *bla*<sub>OXA-66</sub>, *bla*<sub>OXA-72</sub>, *bla*<sub>OXA-239</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, y metallo-betalactamasas como *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> (González-Villoria *et al.*, 2016; Tamayo-Legorreta *et al.*, 2016; Bello-López *et al.*, 2019; Graña-Miraglia *et al.*, 2020; López-Durán *et al.*, 2020). De igual manera, sólo un estudio ha reportado la participación de bombas de expulsión en la resistencia a antibióticos carbapenémicos empleando el inhibidor de bombas de flujo carbonil cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Alcántara-Curiel *et al.*, 2014).

En el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, Bello-López realizó un estudio en cepas de *Acinetobacter* spp. provenientes del Hospital Para

el Niño Poblano. Dentro de ese trabajo encontraron a la especie *A. haemolyticus* como principal causante de IAAS a diferencia de lo reportado a nivel nacional e internacional. De igual manera, reportó la presencia de cepas *A. haemolyticus* resistentes a carbapenémicos y portadoras de un plásmido acarreado *bla*<sub>NDM-1</sub> (Bello-López *et al.*, 2019). Por otro lado, encontraron cepas de *A. baumannii* MDR incluyendo la resistencia a carbapenémicos, aisladas de la unidad de quemados de dicho hospital; estas cepas fueron portadoras de un plásmido acarreado a *bla*<sub>OXA-72</sub> y flanqueada por secuencias de inserción XerC/XerD (Bello-López *et al.*, 2020). Estos reportes sugieren que es importante realizar este tipo de estudios para conocer las cepas circulantes en diferentes hospitales de nuestro país, y más importante aún en el estado de Puebla, así como entender los mecanismos de resistencia que prevalecen y poder tomar acciones para controlar y contener la diseminación de la resistencia antibiótica en los hospitales.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente tanto en México como en otros países se ha visto un incremento en la tasa de infecciones nosocomiales y de la comunidad causadas por las especies del género *Acinetobacter*, ya no solamente por el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*, sino también por especies que antes no se les consideraba como patógenas. Es por ello la importancia de realizar este tipo de estudios que generen información para conocer la epidemiología de cepas de *Acinetobacter* spp. circulantes en diferentes hospitales de Puebla, así como su perfil de resistencia a diversos antibióticos.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar algunos mecanismos de resistencia a los antibióticos en especies de *Acinetobacter* spp. causantes de infecciones en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E., Puebla.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Corroborar la identificación de especies del género *Acinetobacter* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla.
2. Determinar perfil de susceptibilidad a los antibióticos.
3. Genotipificar algunas cepas de interés mediante la secuenciación parcial del gen *rpoB*.
4. Identificar genes involucrados en la resistencia a betalactámicos.
5. Identificar secuencias de inserción tipo IS*Aba* en cepas portadoras de OXA con actividad carbapenemasa y metalo-betalactamasas.
6. Determinar la relación clonal por electroforesis en gel de campos pulsados.
7. Determinar el perfil de plásmidos de cepas multidrogoresistentes.
8. Determinar la participación de bombas de expulsión en la resistencia.
9. Secuenciar el genoma completo de una cepa de interés.

#### **5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO**

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Cepas de estudio**

Se estudiaron 49 cepas de *Acinetobacter* spp., aisladas a partir de diferentes sitios anatómicos de pacientes hospitalizados y ambulatorios en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de la ciudad de Puebla durante el periodo de junio de 2015 a octubre de 2019. Las cepas fueron previamente identificadas con el sistema automatizado Vitek® 2 (bioMérieux).

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

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

#### **6.1.1 Declaración ética**

El protocolo del presente estudio fue revisado y aprobado por el comité de bioética del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla quedando registrado como Proyecto Núm. 188.2018. La información de los pacientes se manejó de manera anónima. Las muestras fueron recolectadas durante procedimientos de rutina para el aislamiento bacteriano y no representaron riesgos adicionales para los pacientes.

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

### 6.1.2 Cepas control.

Se usaron distintas cepas como control positivo para la amplificación de los diferentes genes de resistencia (**Tabla 1**). Los genes que portan dichas cepas control están secuenciados y plenamente identificados.

**Tabla 1. Cepas control.**

Número de cepa	Microorganismo	Genes que portan	Donada por
PE21	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>GES-32</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-62</sub>	LMHyC
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	Dr. Jesús Silva Sánchez
AN54	<i>A. haemolyticus</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-265</sub> , <i>aac</i> (6')-I <sub>g</sub> , IS <i>Aba125-bla</i> <sub>NDM-1</sub> . Cepa control para plásmidos (45.46 kb, 12.8 kb, 11.4 kb y 4.7 kb).	LMHyC
Ab23	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , control para PFGE.	Dr. Jesús Silva Sánchez
Ab24	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	Dr. Jesús Silva Sánchez
Ps52	<i>P. aeruginosa</i>	<i>aac</i> (6')-I <sub>b</sub>	LMHyC
SA42	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>aac</i> (3)-II <sub>a</sub> , <i>aac</i> (6')-I <sub>b</sub>	M.C. Gabriel Abraham González
A11616	<i>A. haemolyticus</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-214</sub> , control para PFGE y plásmidos (7.5 kb, 6.5 kb, 5.1 kb, 3.3 kb).	Dr. Miguel Ángel Cevallos
NCTC50192	<i>E. coli</i>	Cepa de referencia con 4 plásmidos 154 kb, 66 kb, 38 kb y 7 kb	Dr. Ulises Garza Ramos
AN71	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-72</sub> , IS <i>Aba48</i> , IS <i>Aba48-bla</i> <sub>OXA-72</sub> .	LMHyC

### 6.2 Tipificación molecular por *rpoB*

Debido a que entre especies del género *Acinetobacter* presentan características fenotípicas similares en pruebas bioquímicas, y el sistema Vitek® 2 no identifica algunas especies diferentes a *A. baumannii* con alta sensibilidad, se realizó la tipificación molecular de algunas cepas empleando la amplificación por PCR y secuenciación parcial del gen *rpoB* (La Scola *et al.*, 2006). Además, se tomó la presencia de genes tipo *bla*<sub>OXA</sub> cromosómica de algunas especies, como una característica más para corroborar la identificación.

Para el análisis se emplearon las secuencias nucleotídicas de *rpoB* de las 63 especies de *Acinetobacter* encontradas en la base de datos *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (bacterio.net), se alinearon con Clustal Omega y el dendograma se construyó con MEGA7 por el método UPGMA, con 100 repeticiones.

Los oligonucleótidos que se emplearon se muestran en la **tabla 2**.

**Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la tipificación molecular de cepas de *Acinetobacter* spp.**

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

## 6.3 Métodos de sensibilidad a antibióticos

### 6.3.1 Perfil de susceptibilidad por el método Kirby-Baüer

El perfil de susceptibilidad se realizó por el método de difusión con disco en agar (Kirby-Baüer), se probaron 17 antibióticos. Se partió de un cultivo puro de 24 horas que fue sembrado en placas de agar soya tripticasa (TSA), se preparó una suspensión bacteriana en solución salina isotónica (SSI) al 0.85% y se ajustó a una turbidez igual al tubo 0.5 de McFarland, se inoculó homogéneamente con un hisopo estéril en una placa de agar Mueller-Hinton (MH) (BD Bioxon®), y enseguida se colocaron los discos de antibióticos (BD BBL®). Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas y posteriormente se midieron los halos de inhibición clasificando a las cepas de acuerdo con los puntos de corte propuestos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) versión 2020 (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Puntos de corte del CLSI 2020 para *Acinetobacter* spp.**

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

### 6.3.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en agar

Se partió de un cultivo puro de 18-24 h de crecimiento en placas de TSA de las cepas a evaluar, el cual se resuspendió en un tubo con 2 mL de solución salina isotónica (SSI) al 0.85 %, para ajustar la turbidez con un estándar igual al tubo 0.5 de la escala de turbidez de McFarland, que equivale a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente se hizo una dilución 1:10 con SSI (siendo el inóculo de  $1.5 \times 10^7$  UFC/mL) depositando por triplicado 2 µL de ésta suspensión en placas de agar

MH suplementadas con los antibióticos a evaluar y a las diferentes concentraciones (de 2 a 512 µg/mL) (**Tabla 4**), el inóculo final fue de  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL. Una vez inoculadas las placas se esperó a que seicara el inóculo y se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Finalmente se buscó la concentración a la cual ya no hubiera crecimiento de colonias; los puntos de corte se determinaron con base en el CLSI, 2020.

**Tabla 4. Puntos de corte del CLSI 2020 para CMI en *Acinetobacter* spp.**

Antibiótico	Punto de corte CMI (µg/mL)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
Ceftazidima (CAZ)	≥ 32	16	≤ 8
Cefepime (FEP)	≥ 32	16	≤ 8
Meropenem (MEM)	≥ 8	4	≤ 2
Imipenem (IPM)	≥ 8	4	≤ 2
Ciprofloxacino (CIP)	≥ 4	2	≤ 1
Amikacina (AN)	≥ 64	32	≤ 16

#### **6.4 Determinación de la participación de bombas de expulsión en la presencia de los inhibidores de bombas de expulsión L-Fenilalanina-Arginina-β-Naftilamida (PAβN) y Carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP)**

Para determinar la participación de bombas de eflujo de la familia RND (*resistance-nodulation-division family*) en la resistencia a los antibióticos, se realizó CMI para imipenem, meropenem, amikacina y ciprofloxacino por el método de microdilución en agar Müller-Hinton en la ausencia y presencia de L-Fenilalanina-Arginina-β-Naftilamida (PAβN, Sigma-Aldrich) y carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP, Sigma-Aldrich) a 25 mg/L. Previamente se verificó que los inhibidores de bombas de eflujo no fueran tóxicos para las cepas realizando una prueba de crecimiento en agar Müller-Hinton con cada inhibidor a 25 mg/L. Se compararon los puntos de corte de las CMI en presencia y en ausencia del inhibidor de bombas de expulsión (EPI), y una disminución de 2 veces o más y 4

veces o más en el valor de la CMI en la presencia de PAβN y CCCP respectivamente, fue considerado positivo para la participación de bombas de expulsión de la familia RND en la resistencia a los antibióticos. Este experimento se realizó por triplicado (Kumita *et al.*, 2009; Alcántara-Curiel *et al.*, 2014). Se utilizaron a las cepas PE21 (*Pseudomonas aeruginosa*) y AN54 (*Acinetobacter haemolyticus*) como controles positivos, y la cepa PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa*) como control negativo.

### **6.5 Relación clonal por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE)**

La relación clonal de los aislados fue determinada mediante la técnica de PFGE reportada por Durmaz *et al.* (2009), pero con una modificación en el tiempo de corrimiento de 21 horas y además las cepas no fueron sembradas en agar sangre de carnero sino en agar TSA. A continuación, se describe la técnica usada en este trabajo:

- **Preparación de la suspensión bacteriana.**

De un cultivo puro en placa con agar TSA se tomó una asada y se suspendió en 1 ml del buffer (CSB; 100 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 10 mM EDTA). Se ajustó al tubo 4 de turbidez de McFarland ( $1.2 \times 10^9$  UFC/mL). Se mantuvo la suspensión bacteriana a temperatura ambiente antes de ser mezclada con agarosa de bajo punto de fusión (no esperar más de 5 minutos).

- **Preparación de insertos.**

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

- **Lisis de la bacteria *in situ*.**

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

- **Lavado de insertos.**

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

- **Digestión de DNA bacteriano con enzima *ApaI*.**

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

- **Electroforesis en gel de agarosa.**

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

- **Condiciones de electroforesis.**

Pulso inicial de 5 segundos y final de 30 segundos 6 V/cm durante 21 horas. Una vez finalizada la electroforesis se sacó el gel y se tiñó con bromuro de etidio (BET) al 2% durante 10 minutos en agitación, después de destiñó con agua tridestilada y se tomaron fotografías cada 30 minutos durante 4 horas.

### **6.6 Extracción del templado de ADN por el método de lisis por calor**

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

### **6.7 Cuantificación de ADN**

A todos los lisados se les realizó la cuantificación de ADN utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y usando la aplicación del instrumento, seleccionando la opción de Ácidos Nucleicos. Inicialmente el equipo realiza una verificación automática; se limpió el lector del equipo con papel absorbente y se procedió a hacer un blanco con 2 µL de agua inyectable estéril, una vez que se activó la casilla (Measure), se procedió a la medición de los templados, se fue limpiando el lector óptico entre muestras para evitar contaminaciones. Los lisados que resultaron muy concentrados se diluyeron con agua inyectable estéril hasta ajustarlos a una concentración final de 200 ng/µL.

## 6.8 Amplificación de genes de resistencia y secuencias de inserción por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de genes se usó la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific) con sus respectivos componentes que se enlistan en la **tabla 5**.

**Tabla 5. Componentes de mezcla para la reacción de PCR con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific) para la amplificación de genes de resistencia y secuencias de inserción**

Componentes	Concentración inicial	Volumen añadido por tubo ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final de la reacción
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)	5U/ $\mu\text{L}$	0.08	0.04U
Buffer de reacción	10X	1	1X
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1	2.5mM
dNTPs	10mM	0.3	0.3mM
Primer Forward	25 $\mu\text{M}$	0.3	0.75mM
Primer Reverse	25 $\mu\text{M}$	0.3	0.75mM
DNA	250 ng/ $\mu\text{L}$	1	25ng
Agua libre de nucleasas	---	Hasta 10 $\mu\text{L}$	---
Volumen final	---	10 $\mu\text{L}$	---

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diversos genes de resistencia y secuencias de inserción (*ISAbA*) se encuentran en el **Anexo 1**.

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

## 6.9 Visualización de productos de PCR

Los productos de PCR se visualizaron tras realizar electroforesis en geles de agarosa al 1 o 2%, dependiendo del tamaño del producto, a 100 V por 45 min. Se

utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Invitrogen). Los geles fueron teñidos con BET (0.5 g/L) durante 1 minuto y lavados por 15 minutos en agua destilada; para visualizar los fragmentos de ADN, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

#### **6.10 Secuenciación de los productos de PCR**

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

#### **6.11 Análisis de las secuencias de productos de PCR**

Las secuencias se visualizaron en el programa Finch Tv versión 1.4.0 Geospiza. Para editar las secuencias se utilizó el programa Nucleic Acid Sequence Massanger (<http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massager.htm>).

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

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

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

#### **6.12 Extracción de plásmidos por el método de Kieser (1984)**

Se partió de un cultivo masivo, crecido en una placa de agar BHI al 2% de 18-24 hrs. El crecimiento de la bacteria se recolectó y se agregó con un asa bacteriológica a un tubo Eppendorff de 1.5 mL conteniendo 1 mL de solución salina isotónica estéril. Utilizando vórtex se homogeneizó, se centrifugó a 12,000

rpm durante 5 minutos y después con la ayuda de una pipeta de 1000  $\mu$ L se eliminó el exopolisacárido. El lavado anterior se realizó dos veces. Al paquete celular se le adicionó 500  $\mu$ L de solución 1 (Sacarosa 0.3 M, Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 25 mM pH=8) y se resuspendió con una pipeta. Posteriormente, se le adicionaron 100  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL) y se invirtió el tubo suavemente. Esta mezcla se incubó a 4°C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se le adicionaron 300  $\mu$ L de solución 2 (NaOH 5 M, SDS 10%), se homogeneizó y se incubó a 55°C en baño maría durante 30 minutos. Se dejó enfriar en agua por 5 minutos. Se agregaron 100  $\mu$ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogeneizó con vórtex hasta que tornó una coloración blanca uniforme. Después, se centrifugó a 13,000 r.p.m. durante 20 minutos y del sobrenadante se recuperaron 400  $\mu$ L. El sobrenadante se guardó a -20°C. De los 400  $\mu$ L se tomaron 8  $\mu$ L para cargarlos en un gel de agarosa al 0.8% y se corrió una electroforesis horizontal durante 1 hora y media a 100 V con buffer TAE 1X.

### **6.13 Secuenciación masiva de genoma**

Se realizó la secuenciación masiva del genoma de la cepa *A. baumannii* AE38 resistente a carbapenémicos, la cepa proviene de una muestra de expectoración de un paciente del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla.

La cepa fue inoculada en 5 mL de caldo LB durante 24 horas a 37°C y posteriormente se realizó la extracción de ADN. Se siguió el protocolo del Kit de purificación Wizard Genomic ADN Purification Kit, Promega Corporation. Ma, USA. Posteriormente se determinó la concentración y calidad del ADN con el NanoDrop 2000® (Thermo Scientific), y finalmente enviada al lugar a donde fue secuenciada. La secuenciación se llevó a cabo por la tecnología MiSeq Illumina 2x300 con 5 millones de lecturas pareadas, ésta se realizó en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática, IBT, UNAM, Cuernavaca, Moleros, México.

Una vez recibidas las lecturas de la cepa, se realizaron una serie de pasos para su análisis en el servidor del LMHyC.

Pasos para el análisis:

1. La calidad de las lecturas se corroboró con el programa FastQC.
2. Los ensamblajes se realizaron correspondientes con los ensambladores: Velvet v1.2.10 (PLACNETw), SPAdes v. 3.9.0, SPAdes v. 3.11.1.
3. La calidad de los ensamblajes se verificó con el programa Quast.
4. Los genomas se anotaron con RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) v.2.0 (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>).
5. Los genes de resistencia se buscaron con la base de datos ResFinder v.3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), The Comprehensive Antibiotic Resistance Database CARD <https://card.mcmaster.ca/>
6. Se realizó la tipificación multilocus de secuencias (en inglés *Multilocus sequence typing, MLST*) (<https://pubmlst.org/abaumannii/>).
7. Se buscaron e identificaron integrones en la página Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>), y para las Secuencias de Inserción en ISFinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>).
8. Se utilizaron las bases de datos de referencia para Betalactamasas: <http://www.bldb.eu/>

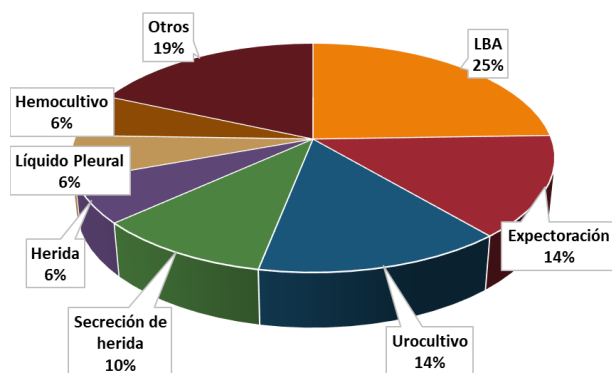
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Procedencia de las cepas

Durante el periodo junio del 2015 a octubre del 2019 se recolectaron 49 cepas de *Acinetobacter* spp., a las cuales se les corroboró su pureza y fueron criopreservadas en el cepario del LMHyC a -70°C.

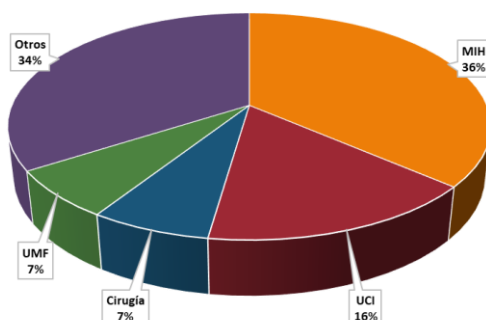
Las 49 cepas provinieron de 44 pacientes diferentes (32 mujeres y 17 hombres), de las cuales 45 cepas fueron recolectadas de pacientes que se encontraban hospitalizados en el momento de la toma de muestra y 4 cepas fueron recolectadas de pacientes ambulatorios. Las cepas fueron aisladas de muestras de lavados broncoalveolares (25%), expectoración (14%), urocultivos (14%), secreciones de heridas (10%), heridas (6%), líquidos pleurales (6%), hemocultivos (6%), entre otros (19%). Los pacientes se encontraban internados en los servicios

de medicina interna (36%), unidad de cuidados intensivos (UCI) (16%), unidad de medicina familiar (7%), cirugía (7%), entre otros (34%). **(Gráficos 1 y 2).**



**Gráfico 1. Porcentaje de cepas de *Acinetobacter* spp. por origen de muestra (n=49).** Los orígenes de muestra de corresponden a Otros incluyen: exudado faríngeo, exudado nasal, exudado vaginal, aspirado traqueal, líquido de diálisis peritoneal, catéter venoso central y secreción de sitio de salida de catéter. **Abreviaturas: LBA:** Lavado broncoalveolar.

Porcentaje de pacientes por servicio hospitalario (n=44)



**Gráfico 2. Porcentaje de pacientes por servicio hospitalario (n=44).** Los servicios hospitalarios que corresponden a Otros incluyen: Pediatría, diálisis peritoneal continua ambulatoria, nefrología, unidad de cuidados intensivos neonatales, ginecología, ortopedía, otorrinolaringología, urología, reumatología, hemodiálisis. **Abreviaturas: MIH:** Medicina interna. **UCI:** Unidad de cuidados intensivos. **UMF:** Unidad de medicina familiar.

## 7.2 Identificación por el sistema Vitek® 2

Los 49 aislados fueron identificados por el sistema Vitek® 2 como especies que pertenecieron al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*

(*Acb*) (37), pero también otras especies como lo son *A. haemolyticus* (7), *A. Iwoffii* (3), *A. ursingii* (1) y *Acinetobacter* spp. (1) (**Gráfico 3**). Una vez resguardadas las cepas, en el LMHyC corroboramos el género bacteriano empleando pruebas bioquímicas.

**Gráfico 3. Porcentaje de especies identificadas por el sistema Vitek2 de las cepas de *Acinetobacter* spp. (n=49). Abreviaturas: *Acb*: Complejo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*.**

### **7.3 Amplificación de marcadores moleculares en cepas de *Acinetobacter* spp.**

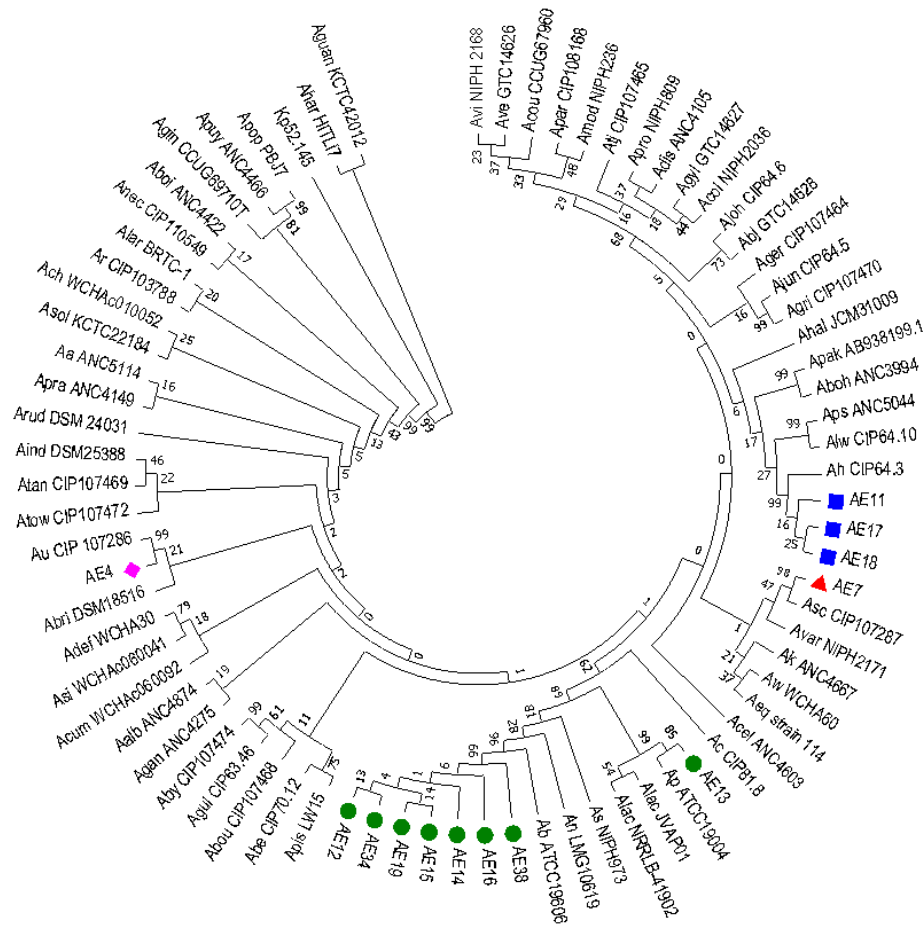
En nuestro estudio, además de emplear la identificación previa realizada por el sistema Vitek® 2 en el hospital, decidimos amplificar el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> en aquellos aislados reportados como especies pertenecientes al complejo *Acb*, y la amplificación del gen *bla*<sub>OXA-214-like</sub> en aquellos aislados reportados como *A. haemolyticus*, ya que estos genes se encuentran de manera constitutiva en el cromosoma de las especies *A. baumannii* y *A. haemolyticus* respectivamente. De 36 cepas reportadas como del complejo *Acb*, sólo a 28 cepas se les amplificó el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, y observamos que 27 de ellas amplificaron de manera positiva y

sólo en 1 cepa no amplificó. De la misma manera, de 7 cepas reportadas como *A. haemolyticus*, todas amplificaron para *bla*<sub>OXA-214-like</sub>.

#### 7.4 Tipificación molecular por *rpoB* de algunas cepas aisladas

Posteriormente decidimos tipificar molecularmente mediante la secuenciación parcial del gen *rpoB* a 13 cepas representativas de cada una de las especies reportadas por el sistema Vitek® 2. Se incluyeron 8 cepas identificadas como pertenecientes al complejo *Acb*, donde la cepa que no amplificó para *bla*<sub>OXA-51-like</sub> estaba incluida, 3 cepas identificadas como *A. haemolyticus*, 1 cepa de *A. lwoffii* y 1 cepa de *A. ursingii*.

Del análisis de los 13 alineamientos de las secuencias del gen *rpoB* se generó un dendograma, cuyos resultados mostraron que la cepa identificada por Vitek® 2 como *A. lwoffii* fue clasificada como *A. schindleri*, mientras que 3 cepas de *A. haemolyticus* sí correspondieron a la especie, y de las 8 cepas clasificadas como del complejo *Acb*, 7 fueron identificadas como *A. baumannii* y la cepa identificada como del complejo *Acb* y que no amplificó para *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, fue clasificada como *A. pittii*, la cual es una especie que se encuentra dentro del complejo *Acb* (**Figura 1**).



**Figura 1. Dendrograma que representa la relación filogenética de 13 cepas de *Acinetobacter* spp. del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, derivada de la secuencia parcial del gen *rpoB* (~350 pb). Método UPGMA p-distance 100 repeticiones con MEGA7 software. Los círculos verdes son especies del complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*; cuadrados azules son *Acinetobacter haemolyticus*; triángulos rojos son *Acinetobacter schindleri* y rombos rosa son *Acinetobacter ursingii*. **Kp:** *Klebsiella pneumoniae*, **Aalb:** *A. albensis*, **Aa:** *A. apis*, **Ab:** *A. baumannii*, **Aby:** *A. baylyi*, **Abj:** *A. beijerinckii*, **Abe:** *A. bereziniae*, **Aboh:** *A. bohemicus*, **Aboi:** *A. boissieri*, **Abou:** *A. bouvetii*, **Abri:** *A. brisouii*, **Ac:** *A. calcoaceticus*, **Acel:** *A. celticus*, **Ach:** *A. chinensis*, **Acou:** *A. colistiniresistens*, **Acum:** *A. cumulans*, **Adef:** *A. defluvi*, **Adis:** *A. dispersus*, **Alac:** *A. lactucae*, **Aeq:** *A. equi*, **Agan:** *A. gandensis*, **Ager:** *A. gernerii*, **Agri:** *A. grimontii*, **Aguan:** *A. guangdongensis*, **Agui:** *A. guillouiae*, **Agyl:** *A. gyllenbergii*, **Ah:** *A. haemolyticus*, **Ahal:** *A. halotolerans*, **Ahar:** *A. harbinensis*, **Aind:** *A. indicus*, **Ajoh:** *A. johnsonii*, **Ajun:** *A. junii*, **Ak:** *A. kookii*, **Alar:** *A. larvae*, **Alw:** *A. lwoffii*, **Amod:** *A. modestus*, **Anec:** *A. nectaris*, **An:** *A. nosocomialis*, **Apak:** *A. pakistanensis*, **Apar:** *A. parvus*, **Apis:** *A. piscícola*, **Ap:** *A. pittii*, **Apop:** *A. populi*, **Apra:** *A. pragensis*, **Apro:** *A. proteolyticus*, **Aps:** *A. pseudolwoffii*, **Apuy:** *A. puyangensis*, **Agin:** *A. gingfengensis*, **Ar:** *A. radioresistens*, **Arud:** *A. rudis*, **Asc:** *A. schindleri*, **As:** *A. seifertii*, **Asi:** *A. sichuanensis*, **Asol:** *A. soli*, **Atan:** *A. tandoii*, **Atj:** *A. tjernbergiae*, **Atow:** *A. towneri*, **Au:** *A. ursingii*, **Avar:** *A. variabilis*, **Ave:** *A. venetianus*, **Avi:** *A. vivianii*, **Aw:** *A. wuhoensis*.**

## 7.5 Fenotipo de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Acinetobacter* spp.

Para conocer el fenotipo de sensibilidad a los antibióticos de las 49 cepas, el estudio se dividió en dos: El fenotipo de sensibilidad de las 37 cepas del complejo *Acb* y el fenotipo de las 12 especies no pertenecientes al complejo *Acb*.

De las 37 cepas del complejo *Acb* 70% fueron resistentes a penicilinas (piperacilina), 54% a las combinaciones betalactámicos/inhibidores de betalactamasas (ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y ticarcilina/ácido clavulánico), 68% a cefalosporinas (ceftazidima, cefepima, cefotaxima y ceftriaxona), 69% a carbapenémicos (imipenem y meropenem), 70% a aminoglucósidos (gentamicina, amikacina y tobramicina), 61% a tetraciclinas, 69% a fluoroquinolonas (ciprofloxacina y levofloxacina) y 64% a sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim) (**Gráfico 4**).

**Gráfico 4. Perfil de resistencia a antibióticos de cepas del complejo *Acb* obtenido por el método de Kirby-Baüer (n=37).** El número sobre las barras representan el número de cepas que fueron sensibles, intermedias o resistentes respectivamente. **Abreviaturas:** **PIP:** Piperacilina, **SAM:** Ampicilina-Sulbactam, **TZP:** Piperacilina-Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina-Ácido clavulánico, **CAZ:** Ceftazidima, **FEP:** Cefepime, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona, **IPM:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NN:** Trobamicina, **TET:** Tetraciclina, **CIP:** Ciprofloxacino, **LVX:** Levofloxacino, **SXT:** Sulfametoxazol-Trimetoprim.

Cabe mencionar que casi todas las cepas clasificadas como especies no pertenecientes al complejo *Acb* fueron sensibles a todos los antibióticos probados, con excepción de 1 cepa *A. haemolyticus* y 1 cepa *Acinetobacter* spp. que fueron resistentes a piperacilina y amikacina; y piperacilina, ciprofloxacina, levofloxacina y sulfametoxazol/trimetoprim respectivamente (**Gráfico 5**).

**Gráfico 5. Perfil de resistencia a antibióticos de cepas ambientales obtenidos por método Kirby-Baüer (n=12).** El número sobre las barras representan el número de cepas que fueron sensibles, intermedias o resistentes respectivamente. **Abreviaturas:** **PIP:** Piperacilina, **SAM:** Ampicilina-Sulbactam, **TZP:** Piperacilina-Tazobactam, **TIM:** Ticarcilina-Ácido clavulánico, **CAZ:** Ceftazidima, **FEP:** Cefepime, **CTX:** Cefotaxima, **CRO:** Ceftriaxona, **IPM:** Imipenem, **MEM:** Meropenem, **GM:** Gentamicina, **AN:** Amikacina, **NN:** Trobamicina, **TET:** Tetraciclina, **CIP:** Ciprofloxacino, **LVX:** Levofloxacino, **SXT:** Sulfametoxazol-Trimetoprim.

Para continuar con el estudio se seleccionó un grupo de 25 cepas pertenecientes al complejo *Acb* las cuales por la presencia de *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y en algunos casos (AE12, AE14, AE15, AE16, AE19, AE34 y AE38) corroborado por tipificación molecular se determinó que pertenecían a la especie *A. baumannii*.

De acuerdo con los criterios establecidos por Magiorakos *et. al.* (2012) estas 25 cepas de *A. baumannii* se definieron como multidrogo-resistentes (MDR), y presentaron resistencia a carbapenémicos (RC). Las 25 cepas provenían de 22 pacientes hospitalizados y de 2 pacientes ambulatorios. Cabe mencionar que las cepas AE30A y AE30B fueron aisladas del mismo paciente en diferentes tomas de muestra.

Al grupo de 25 cepas de *A. baumannii* se les determinó la CMI de algunos antibióticos, esto con el fin de conocer el comportamiento de las cepas hacia estos antibióticos. Con esta metodología se observó que las cepas presentaron valores de 128 hasta  $\geq 512$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  para ceftazidima, cefepime e imipenem, mientras que para meropenem variaron de 32 hasta 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para el caso de amikacina las cepas presentaron valores entre 128 y  $\geq 512$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y por último para ciprofloxacino los valores que presentaron las cepas fueron entre  $\geq 64$  hasta 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con excepción de una cepa que fue 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Gráfico 6**).

**Gráfica 6. Concentración Mínima Inhibitoria de cepas *A. baumannii* MDR (n=25).** El número sobre las barras representan el número de cepas. **Abreviaturas:** **CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria, **MEM:** Meropenem, **IPM:** Imipenem, **CAZ:** Ceftazidima, **FEP:** Cefepime, **AN:** Amikacina, **CIP:** Ciprofloxacino.

## **7.6 Genotipo de resistencia a los antibióticos de 25 cepas *A. baumannii* MDR**

De acuerdo al fenotipo de susceptibilidad antibiótica que presentaron las cepas, se decidió determinar el genotipo de resistencia a los antibióticos que portaban las 25 cepas *A. baumannii* MDR, mediante PCR y secuenciación, encontrando que de las 25 cepas el 100% (25) fueron portadoras de *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y *bla*<sub>OXA-24-like</sub> que al mandarlas a secuenciar correspondieron a las variantes *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>OXA-72</sub>, respectivamente;

12% (3) fueron portadoras de *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, 36% (9) de *bla*<sub>NDM-like</sub>, y 4% (1) de *bla*<sub>IMP-like</sub> (Gráfico 7).

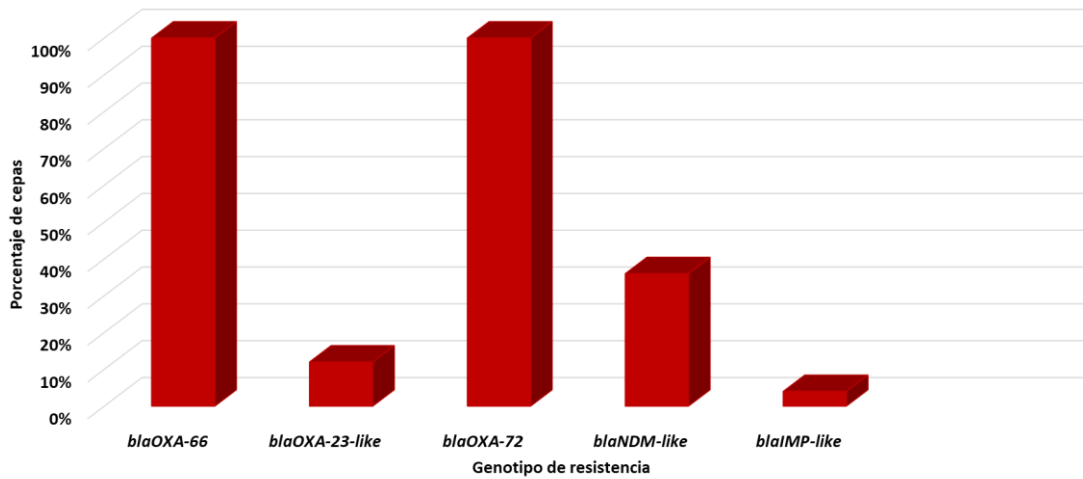


Gráfico 7. Porcentaje de cepas *A. baumannii* MDR portadoras de genes de betalactamasas determinado por PCR y secuenciación (n=25).

### 7.7 Entornos genéticos de las betalactamasas presentes en cepas *A. baumannii* MDR

Con la finalidad de conocer el entorno genético de betalactamasas con actividad carbapenemasas nos dimos a la tarea de buscar a las secuencias de inserción *ISAb*<sub>1</sub>, *ISAb*<sub>125</sub> e *ISAb*<sub>48</sub> en diferentes arreglos con *bla*<sub>OXA-66</sub>, *bla*<sub>OXA-72</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y *bla*<sub>NDM-like</sub> por PCR y secuenciación.

Obtuvimos que en 21 cepas se encontró al arreglo *ISAb*<sub>48</sub> río arriba de *bla*<sub>OXA-72</sub>, y en 1 cepa (AE34) no se encontró el mismo arreglo, sin embargo, la cepa si se encontró la secuencia de inserción *ISAb*<sub>48</sub>. En 3 cepas (AE14, AE16 y AE19) no se encontró el arreglo ni a la secuencia de inserción. De igual manera en todos los aislados que fueron portadores de *bla*<sub>NDM-like</sub>, se encontró el arreglo de *ISAb*<sub>125</sub> río arriba del gen (Figura 3).

**Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. A) Arreglo de IS*Aba48* río arriba de *bla*<sub>OXA-72</sub>. B) Arreglo de IS*Aba125* río arriba de *bla*<sub>NDM-like</sub>.**

### **7.8 Relación clonal de las 25 cepas *A. baumannii* MDR**

Para conocer si las cepas circulantes en el hospital de estudio se encontraban relacionadas genéticamente se realizó PFGE. Dentro del dendograma generado a partir del PFGE-Apal de 24 cepas *A. baumannii* MDR se detectaron 7 pulsotipos o patrones de bandas diferentes con un coeficiente DICE  $\geq 0.85$  por lo que estas cepas se encuentran genéticamente relacionadas (**Figura 2**). Cabe mencionar que la cepa AE34 fue no tipificable bajo las mismas condiciones de PFGE. De manera general, se pueden observar dos grupos de cepas, que a su vez se dividen en 7 subgrupos o pulsotipos diferentes (A al G). El pulsotipo A correspondió a la cepa AE14 proveniente del servicio de nefrología, esta cepa presentó relación genética con dos subtipos: A1 correspondiente a la cepa AE16 y A2 a la cepa AE19, las cuales fueron aisladas del servicio de cirugía y de la unidad de medicina familiar respectivamente. El pulsotipo B está conformado por las cepas AE22 y AE23 aisladas de la UCI; y una cepa subtipo B1 (AE25) proveniente del servicio de medicina interna. El pulsotipo C está conformado por las cepas AE26, AE28, AE29, AE30A y AE30B aisladas de los servicios de medicina interna y ortopedia, además de dos cepas subtipos C1 (AE32) y C2 (AE27) provenientes también de la unidad de medicina interna. El pulsotipo D lo integra la cepa AE31 procedente de la unidad de medicina interna. El pulsotipo E está constituido por las cepas AE45 aislada en la unidad de medicina interna y la cepa AE47 procedente de un

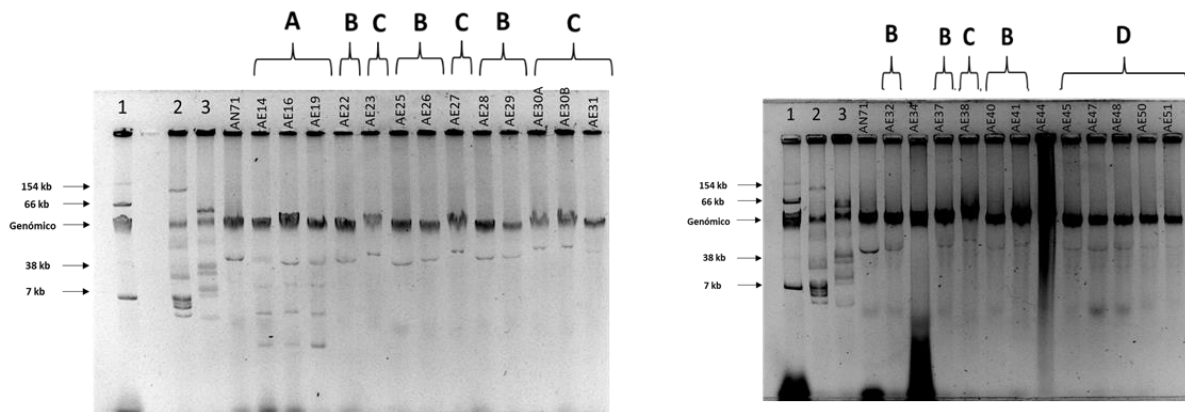
paciente no hospitalizado (consulta externa), además de contar con 5 subtipos E1 (AE44), E2 (AE41), E3 (AE40), E4 (AE38) y E5 (AE37) provenientes de distintos servicios hospitalarios. El pulsotipo F comprendió a la cepa AE50 y subtipo F1 (AE51) provenientes de la UCI y medicina interna respectivamente. El pulsotipo G constó en la cepa AE48 procedente de la UCI del hospital.

**Figura 3. Dendograma por PFGE-Apal de 24 cepas *A. baumannii* MDR, aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.T.E de Puebla México.** Las 24 cepas fueron agrupadas en 7 PFGE tipos diferentes de acuerdo con su patrón de bandas y el coeficiente DICE  $\geq 0.85$ . **MIH:** Medicina interna. **UCI:** Unidad de cuidados intensivos.

### **7.9 Perfil plasmídico de 25 cepas *A. baumannii* MDR**

*A. baumannii* es particularmente capaz de adquirir y expresar nuevos mecanismos de resistencia en respuesta a la presión ejercida por antibióticos. Dentro de estos mecanismos, es común la adquisición de carbapenemasas codificadas por plásmidos, específicamente las de tipo *bla*<sub>OXA</sub>. Por lo que se investigó si las cepas en estudio portaban plásmidos, y si el perfil plasmídico era similar entre ellas. Los resultados mostraron 4 perfiles de bandas plasmídicas diferentes: un perfil A

conformado por 3 cepas (AE14, AE16 y AE19) y que mostraron 4 bandas plasmídicas. El perfil B conformado por 9 cepas (AE22, AE25, AE26, AE28, AE29, AE32, AE37, AE40 y AE41) que mostraron una única banda plasmídica. Un perfil C conformado por 6 cepas (AE23, AE27, AE30A, AE30B, AE31 y AE37) que también presentó una única banda plasmídica, pero con una menor distancia de migración a la banda plasmídica del grupo anterior. Y un perfil D que consta de 5 cepas (AE45, AE47, AE48, AE50 y AE51) que mostraron dos bandas plasmídicas (**Figura 4**). En las cepas AE34 y AE44 no se logró una buena extracción plasmídica bajo las mismas condiciones ensayadas.



**Figura 4. Extracción plasmídica por el método modificado de Kieser de 25 cepas de *A. baumannii* MDR aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla México.** Línea 1: *E. coli* NCTC 50192 con 4 plásmidos: 154 kb, 66 kb, 38 kb y 7 kb. Línea 2: *A. haemolyticus* 11616 con 4 plásmidos: 7.5 kb, 6.5 kb, 5.1 kb y 3.3 kb. Línea 3: *Acinetobacter haemolyticus* AN54 con 4 plásmidos: 45.46 kb, 12.8 kb, 11.4 kb y 4.7 kb.

### 7.10 Participación de bombas de expulsión en la resistencia a imipenem, meropenem, amikacina y ciprofloxacino en 25 cepas *A. baumannii* MDR

Para determinar el papel de las bombas de expulsión en la resistencia a algunos antibióticos, se determinó la CMI en presencia y ausencia de dos inhibidores diferentes: Fenilalanina-Arginina- $\beta$ -Naftilamida (PA $\beta$ N) y Carbonil-Cianuro-3-Clorofenilhidrazona (CCCP) a 25 mg/L. Se consideró una disminución de 2 o más veces en el valor de la CMI como fenotipo positivo para la participación de bombas de expulsión empleando el inhibidor PA $\beta$ N (Kumita *et al.*, 2009), mientras que una

disminución de 4 o más veces en el valor de la CMI en presencia del inhibidor CCCP se consideró como fenotipo positivo a la participación de bombas de expulsión (Alcántara-Curiel *et al.*, 2014).

En presencia del primer inhibidor PA $\beta$ N, en la CMI para imipenem se observó que 12 cepas (AE22, AE23, AE25, AE26, AE27, AE28, AE29, AE38, AE41, AE45, AE47 y AE48) mostraron una disminución de 2 veces en el valor de la CMI (de 512 a 256 y de 256 a 128  $\mu$ g/mL); mientras que 3 cepas (AE31, AE32 y AE40) mostraron una disminución de hasta 4 veces el valor (de 512 a 128  $\mu$ g/mL). En el caso de meropenem, se observó en 10 cepas (AE14, AE19, AE22, AE23, AE26, AE27, AE28, AE30B, AE31 y AE45) una disminución de 2 veces en su valor de la CMI (de 512 a 256, de 256 a 128, de 64 a 32 y de 32 a 16  $\mu$ g/mL), demostrando la participación de las bombas de expulsión en la resistencia a carbapenémicos **(Tabla 6)**.

Adicionalmente, observamos que en presencia del inhibidor CCCP en la CMI para carbapenémicos no se observó disminución alguna en el valor de la CMI, y en el caso particular de meropenem, 6 cepas (AE22, AE23, AE26, AE27, AE28 y AE31) mostraron en lugar de una disminución, un aumento en el valor de la CMI (de 256 a 512 y de 512 a >512  $\mu$ g/mL) **(Tabla 6)**.

Por otro lado, en presencia del inhibidor PA $\beta$ N en la CMI para amikacina, se observó que en 3 cepas (AE25, AE26 y AE50) disminuyó 2 veces el valor de la CMI (de 512 a 256  $\mu$ g/mL), en 2 cepas (AE16 y AE19) disminuyó 4 veces (de 512 a 128 y de 128 a 32  $\mu$ g/mL) y en 1 cepa (AE14) disminuyó hasta 8 veces en el mismo valor (de 512 a 64  $\mu$ g/mL) **(Tabla 6)**.

En presencia de CCCP, la CMI para amikacina mostró en 2 cepas (AE14 y AE19) una disminución de 4 a 8 veces en el valor de la CMI (de 512 a 64 y de 128 a 32  $\mu$ g/mL), mientras que en la cepa AE16 se observó una disminución de hasta 16 veces en el mismo valor (de 512 a 32  $\mu$ g/mL) **(Tabla 6)**.

Por último, en 8 cepas (AE14, AE16, AE22, AE25, AE26, AE29, AE40 y AE48) en presencia de PA $\beta$ N, el valor de CMI para ciprofloxacino mostró disminuciones de 2

veces en la CMI (de 512 a 256, de 256 a 128 y de 128 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); y en presencia de CCCP se observó que 3 cepas (AE14, AE22 y AE29) presentaron una disminución de 4 veces en el valor de la CMI para este antibiótico (de 512 a 128 y de 256 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y la cepa AE16 disminuyó hasta 8 veces (de 512 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), **(Tabla 6)**.

Es importante destacar que tuvimos cepas que para ambos antibióticos (amikacina y ciprofloxacino), en presencia del inhibidor CCCP, presentaron una disminución en el valor de la CMI, pero no lo suficiente para considerarse como fenotipo positivo (marcadas en azul) **(Tabla 6)**.

**Tabla 6. Participación de bombas de expulsión en 25 cepas *A. baumannii* MDR.**

Concentración mínima inhibitoria en presencia y ausencia de dos inhibidores de bombas de expulsión diferentes. Marcadas en color rojo corresponden aquellas cepas que disminuyeron las veces necesarias el valor de la CMI para considerarse como fenotipo positivo. Marcadas en color azul corresponden aquellas cepas que no disminuyeron las veces necesarias el valor de la CMI para considerarse como fenotipo positivo. **Abreviaturas.** **CMI:** Concentración mínima inhibitoria. **IPM:** Imipenem. **MEM:** Meropenem. **AN:** Amikacina. **CIP:** Ciprofloxacino. **PAβN:** Fenilalanina-Arginina-β-Naftilamida. **CCCP:** Carbonil Cianuro 3-Clorofenilhidrazona. **ND:** No determinado.

### 7.11 Secuenciación masiva del genoma de la cepa *A. baumannii* AE38

Se secuenció la cepa de *A. baumannii* AE38, MDR y resistente a carbapenémicos que se aisló de una muestra de expectoración de un paciente masculino de 62 años y que fue ingresado al servicio de cirugía del hospital.

La cepa presentó resistencia a todos los antibióticos probados, y mostró CMIs altas a carbapenémicos, cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. En cuanto al genotipo de resistencia, se detectó por PCR la presencia de *bla*<sub>OXA-66</sub>,

*bla*<sub>OXA-72</sub> y *bla*<sub>NDM-like</sub>. Asimismo, se observó participación de bombas de expulsión en la resistencia sólo hacia imipenem disminuyendo 2 veces el valor de la CMI para este antibiótico en presencia del inhibidor PAβN. Cabe mencionar que aún no se probó el inhibidor CCCP con meropenem, amikacina y ciprofloxacino, pero posteriormente se evaluará.

Luego de obtener las secuencias se verificó la calidad de las lecturas mediante el programa FastQC. Los ensamblados *de novo* obtenidos fueron evaluados y comparados entre sí mediante la herramienta QUAST y fue seleccionado el ensamblado con SPAdes y sin *trimming* (Tabla 7).

**Tabla 7. Comparación de ensamblados con y sin *trimming* utilizando la herramienta QUAST.**

Ensamble	<i>Trimming</i>	Ensamblador	Contings	Conting más largo	N50 (pb)	Total (pb)
<b>AE38s</b>	<b>No</b>	<b>SPAdes</b>	<b>115</b>	<b>367525</b>	<b>107996</b>	<b>3838803</b>
AE38st	Sí	SPAdes	112	364581	110396	3837731
AE38v	No	Velvet	177	187218	54990	52731
AE38vt	Sí	Velvet	177	187254	3797314	3800403

**Nota:** Los datos de los genomas secuenciados fueron obtenidos al realizar el análisis de los diferentes ensamblados por programa Quast. El mejor ensamblado y que fue seleccionado está resaltado en letras negritas.

### 7.11.1 Tipificación multilocus

La tipificación multilocus de secuencias (MLST) mostró que la cepa AE38 es *A. baumannii* y pertenece a la secuencia tipo (ST) 2 del esquema Pasteur y al ST 369 del esquema Oxford.

### 7.11.2 Análisis del resistoma y elementos genéticos movilizables asociados con la resistencia a antibióticos en la cepa *A. baumannii* AE38

El análisis de la secuenciación del genoma completo reveló que la cepa AE38 posee un cromosoma con un tamaño aproximado de 3.8 Mb. Por la anotación del ensamblado del genoma se localizaron en el cromosoma de la cepa genes que codifican para betalactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos

**(Tabla 8).** Cabe mencionar que no se logró localizar al gen *bla*<sub>NDM-like</sub> ni el arreglo IS*Aba125-bla*<sub>NDM-like</sub> que previamente había sido identificado mediante PCR en esta cepa.

De igual manera, se encontraron genes que codifican para diferentes sistemas de bombas de expulsión: *adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adeI*, *adeJ*, *adeK*, *abeS*, *abaQ*, *amvA*, *macA*, *macB*, *ermA*, *ermB* y *tolC* **(Tabla 8)**. No se localizaron las secuencias nucleotídicas de los genes reguladores *adeS* y *adeR* del sistema AdeABC. La proteína AdeA presentó una delección de 154 aminoácidos en su extremo amino terminal **(Anexo 3)**. Todos los genes localizados que codifican para las subunidades de diferentes sistemas de expulsión, así como reguladores, presentaron un 100% de cobertura e identidad con las secuencias nucleotídicas de la cepa *A. baumannii* ACICU (GenBank: NZ\_CP031380.1), mientras que con la cepa *A. baumannii* AYE (GenBank: NC\_010410.1) presentaron 100% de cobertura y 98% de identidad, con excepción del gen regulador AdeN que presentó 96% de cobertura y 100% de identidad.

De las proteínas reguladoras de los 3 principales sistemas de expulsión de la familia RND sólo la proteína reguladora AdeN del sistema AdeIJK presentó 5 cambios aminoacídicos (Leu211Phe, Lys212Ser, Gly213Val, His215Asp y Val217Asn). Por otro lado, las proteínas que codifican para la unidad de reconocimiento de los sustratos: AdeB tuvo 6 cambios aminoacídicos (Gly306Val, Asn427Ser, Ala552Thr, Ala643Asp, Thr646Ser y Leu731Phe), mientras que AdeG y AdeJ presentaron un sólo cambio aminoacídico Val514Leu y Lys847Glu respectivamente. Todos los cambios aminoacídicos fueron detectados al comparar las secuencias con las de la cepa de referencia ATCC 17978 (GenBank: NZ\_CP053098.1) sensible a los antibióticos **(Anexos 5, 9, 11, 13 y 20)**.

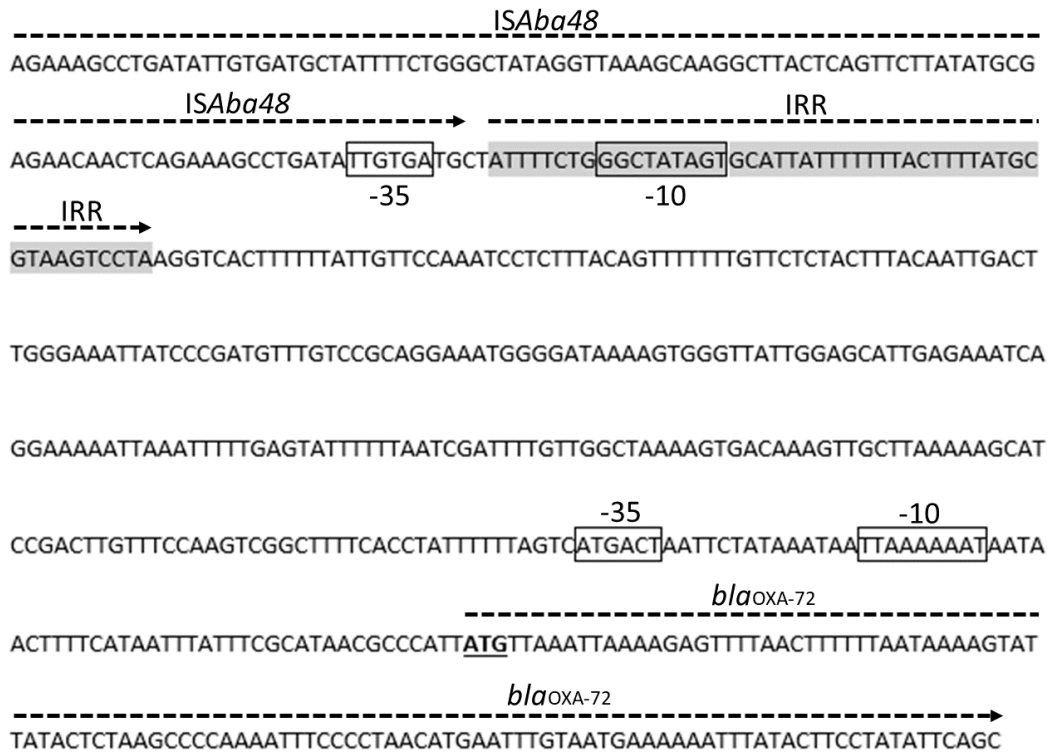
**Tabla 8. Datos de la cepa *A. baumannii* AE38 MDR y resistente a carbapenémicos.**



**Figura 5. Representación del integron que porta la cepa AE38.**

### **7.11.3 Estudio del plásmido portador de *bla*<sub>OXA-72</sub> en la cepa AE38**

Utilizando la plataforma PLACNETw se logró obtener la secuencia de un plásmido contenido en un *contig* en el ensamble con SPAdes. El plásmido se nombró pAbaAE38, y tiene una longitud aproximada de 10017 pb, un contenido del 35% de G+C y 13 marcos de lecturas abiertos. En su estructura se identificaron genes de movilización y replicación (*mobA/mobL* y *repA*), además de genes accesorios que codifican para proteínas unidoras de ADN (*DNA-binding protein* y *Arc*) y una proteína con dominio *helix-turn-helix*, además de 5 genes que codifican para proteínas hipotéticas de función desconocida. Además de manera interesante se encontró a la secuencia de inserción IS*Aba48* río arriba del gen de resistencia *bla*<sub>OXA-72</sub>, y empleando el algoritmo predictivo de BPROM se encontró que la secuencia invertida repetida derecha (IRR) de IS*Aba48* se insertó y sobrepuso en una secuencia promotora (**Figura 6**). Asimismo, se encontraron los sitios de recombinación XerC/XerD flaqueando la región comprendida de *Arc* y *bla*<sub>OXA-72</sub>.

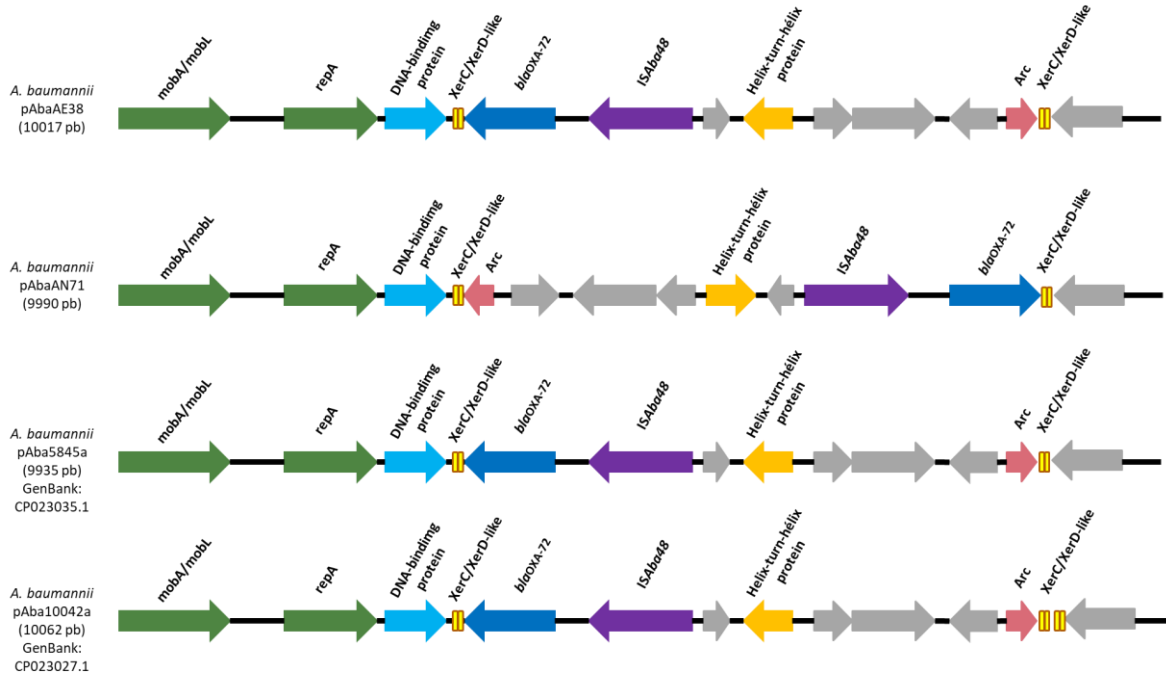


**Figura 6. Representación gráfica de localización de secuencias promotoras para la expresión del gen *bla<sub>OXA-72</sub>* en la cepa *A. baumannii* AE38.** En negritas y subrayado se encuentra el codón de inicio del gen *bla<sub>OXA-72</sub>*. Las secuencias promotoras correspondientes a las cajas -10 y -35 se encuentran encerradas en rectángulos. La zona sombreada en gris corresponde a la secuencia invertida repetida derecha (IRR) de la secuencia de inserción *ISAb48*.

El plásmido pAbaAE38 tuvo 100% de identidad y 100% de cobertura con el plásmido pAba10042a (10062 pb) [GenBank: NZ\_CP023027.1], 99.98% de identidad y 100% de cobertura con el plásmido pAba5845a (9935 pb) [GenBank: NZ\_CP023035.1], 99.93% de identidad y 90% de cobertura con el plásmido pAba9201a (9024 pb) [GenBank: NZ\_CP023021.1] de cepas clínicas de *A. baumannii* aisladas de otros estados en México.

En la **Figura 7** se muestra la representación del arreglo de genes del plásmido pAbaAE38 comparándolo con otros plásmidos incluyendo el plásmido pAbaAN71 reportado por Bello-López de un aislado de *A. baumannii* proveniente de otro hospital poblano. Se pudo observar que la región flanqueada por las secuencias

de inserción XerC/XerD, que comprende del gen *bla*<sub>OXA-72</sub> hasta *Arc*, se encuentra en sentido inverso en el plásmido pAbaAN71, pero se mantiene insertado en el mismo sentido en los plásmidos pAba10042a y pAba5845a.



**Figura 7. Representación de la secuencia del plásmido pAbaAE38 y la comparación con los plásmidos pAbaAN71, pAba5845a y pAba10042a portadores de *bla*<sub>OXA-72</sub>.** En verde se resaltan a los genes involucrados en la movilización y replicación, en azul al gen *bla*<sub>OXA-72</sub>, en morado a la secuencia de inserción *ISAbac48*, en rosa al gen *Arc*, en gris a las proteínas putativas y en rectángulos amarillos a las secuencias de inserción XerC/XerD.

## 8. DISCUSIÓN

Las infecciones causadas por especies del complejo *Acb* han ido en aumento en los últimos años, convirtiéndose en un problema de salud pública alrededor del mundo, y México no está exento de ello. *A. baumannii* es la especie más frecuentemente aislada como causante de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad, seguido de *A. pittii* y *A. nosocomialis*. Estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar piel y superficies inertes, y actualmente presentan

resistencia a los antibióticos, lo que en conjunto les permite sobrevivir en el ambiente hospitalario (Bello-López *et al.*, 2019; Villalón *et al.*, 2019; Gaiarsa *et al.*, 2019).

En este trabajo se estudiaron cepas clínicas de *Acinetobacter* spp. del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, de los cuales 39% fueron aisladas de secreciones respiratorias (lavados broncoalveolares y expectoraciones), 14% de urocultivos, 10% de secreciones de herida, entre otros (37%), y provenían principalmente del servicio de medicina interna (MIH) (43%) y unidad de cuidados intensivos (UCI) (14%). Estos datos concuerdan con lo reportado por Alcántara-Curiel *et al.*, (2019), donde el primer sitio de aislamiento fueron secreciones respiratorias (42%), seguido de secreciones de herida (23%) y provenían principalmente de los servicios de medicina interna y la UCI.

Debido a la creciente importancia que ha adquirido el género *Acinetobacter* como causante de infecciones nosocomiales y de la comunidad, la identificación precisa de la especie es importante a la hora de la toma de decisiones, particularmente cuando se tratan de aislados con resistencia a múltiples antibióticos. Diversos estudios han señalado que los métodos bioquímicos tradicionales son insuficientes para una adecuada discriminación entre especies, por lo que se requieren técnicas moleculares para lograr con certeza la identificación (Lee *et al.*, 2017). Desafortunadamente no todos los laboratorios de diagnóstico de rutina en los hospitales mexicanos tienen acceso a técnicas moleculares para la identificación de especies de este género, por lo que se emplean sistemas con métodos basados en el metabolismo bacteriano como lo son Vitek® 2 y API® 20NE que no siempre son específicos.

Al igual que en otros estudios realizados en diferentes lugares de la república mexicana, nosotros reportamos una alta prevalencia (74%) de aislados de especies pertenecientes al complejo *Acb* causantes de infecciones. Cabe mencionar que estos estudios emplearon metodologías basadas en el metabolismo bacteriano como lo son el sistema Vitek® 2 y API® 20NE para la identificación de especies en sus aislados, además de la amplificación de *bla*<sub>OXA-51</sub>.

like que se trata de un gen constitutivo en el cromosoma de las especies *A. baumannii* (Alcántara-Curiel *et al.*, 2014; Alcántara-Curiel *et al.*, 2019; López-Durán *et al.*, 2020). En nuestro estudio obtuvimos un 92% de correspondencia entre la identificación por el sistema Vitek® 2, amplificación de *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y *bla*<sub>OXA-214-like</sub>, y *rpoB*, lo cual coincide con lo reportado por Lee *et al.* (2015) y Lukovic *et al.* (2020) los cuales reportan un 90% y 84.6%, respectivamente, de correspondencia con la identificación de especies entre metodologías diferentes: amplificación de *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *rpoB*, MALDI-TOF MS y Vitek® 2.

El análisis de los perfiles de susceptibilidad de las 49 cepas provenientes de este hospital muestra que la resistencia a los antibióticos probados proviene de cepas clasificadas como pertenecientes al complejo *Acb*, mientras que las especies fuera de este complejo o también denominadas ambientales fueron sensibles, lo que es congruente con lo reportado a nivel mundial donde asocian al complejo *Acb* como principal causante de infecciones y que presentan resistencia a múltiples antibióticos (Facciola *et al.*, 2019; Villalón *et al.*, 2019; Gaiarsa *et al.*, 2019). De acuerdo con el perfil de susceptibilidad, 25 cepas del complejo *Acb* fueron clasificadas como MDR, ya que presentaron resistencia a 1 o más agentes en 3 o más categorías antibióticas (Magiorakos *et al.*, 2012).

El tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* a menudo representa un desafío para el médico, debido a la falta o escasez de antibióticos eficaces; este fenómeno se ve reflejado en 25 cepas ensayadas de *A. baumannii*, ya que presentaron valores altos de CMI (entre 128 y  $\geq 512$   $\mu\text{g/mL}$ ) para antibióticos de primera elección como son cefalosporinas de 3ra y 4ta generación (ceftazidima y cefepime), aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Y aún más preocupante, porque presentaron valores de hasta 512  $\mu\text{g/mL}$  para imipenem y meropenem que son tratamientos de última opción para infecciones por cepas MDR (Garnacho *et al.*, 2019).

En *A. baumannii* se han reportado múltiples mecanismos de resistencia a los antibióticos los cuales pueden ser constitutivos o adquiridos. Dichos mecanismos incluyen la modificación enzimática del antibiótico, cambios en la permeabilidad de

la membrana, sistemas de expulsión y modificaciones en los sitios blancos (Lee *et al.*, 2017). Uno de los mecanismos más comúnmente reportado en *A. baumannii* es la producción de betalactamasas, de las cuales las de tipo OXA son las más reportadas en este género bacteriano (Poirel *et al.*, 2010). Dentro de este grupo de betalactamasas, se encontró prevalente en todos los aislados a *bla*<sub>OXA-66</sub> que pertenece a la familia *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y cuyo gen codificante se encuentra localizado en el cromosoma de las especies *A. baumannii* (June *et al.*, 2016). Esta variante es una de las más predominantes de esta familia y su presencia se ha asociado con la clona internacional 2 (IC2), la cual es la clona de *A. baumannii* más prevalente en el mundo (Aly *et al.*, 2014; Opazo-Capurro *et al.*, 2019; Villalón *et al.*, 2019; Al-Hassan *et al.*, 2020). Esta enzima está asociada con baja actividad hacia carbapenémicos, aunque se ha observado que la presencia de IS*Aba1* río arriba puede aumentar la actividad hidrolítica de esta enzima, no obstante este arreglo genético no fue encontrado en nuestras cepas en estudio (Zander *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2014; Ewers *et al.*, 2017; Saranathan *et al.*, 2017).

En este estudio, encontramos tres aislados (AE14, AE16 y AE19) portadores del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, el cual puede localizarse en el cromosoma o en plásmidos. Esta betalactamasa se ha asociado con diferentes entornos genéticos como son transposones (Tn2006, Tn2007 y Tn2008) y secuencias de inserción (IS*Aba1*, IS*Aba4* e IS*Aba10*), los cuales pueden participar en la movilización y sobreexpresión de esta carbapenemasa (Ewers *et al.*, 2016; Pagano *et al.*, 2016). Si bien, la familia *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, es la carbapenemasa más prevalente en *A. baumannii* en todo el mundo (Lv *et al.*, 2019), en México únicamente la variante *bla*<sub>OXA-239</sub> perteneciente a esta familia, ha sido reportada en algunos aislados clínicos (González-Villoria *et al.*, 2016; Graña-Miraglia *et al.*, 2020), lo cual sugiere verificar que las cepas ensayadas en este estudio porten esta variante.

Otra oxacilinasas que encontramos en este estudio fue *bla*<sub>OXA-72</sub> perteneciente a la familia *bla*<sub>OXA-24/40</sub> y que fue identificada por primera vez en 2004 en un aislado de *A. baumannii* en Tailandia (Chanawong *et al.*, 2004) (Genbank Accesion No. AY739646). Actualmente, cepas de *A. baumannii* acarreadoras de esta

betalactamasa han sido reportadas en varios países de Asia, Europa y América (Tamayo-Legorreta *et al.*, 2016; Brasiliense *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018). Cabe mencionar que alrededor del mundo *bla*<sub>OXA-23-like</sub> es la carbapenemasa más reportada en aislados clínicos de *A. baumannii*, no obstante, en nuestro caso *bla*<sub>OXA-72</sub> fue la carbapenemasa prevalente en las 25 cepas ensayadas, lo cual es consistente con lo reportado en diferentes estudios realizados en México (Alcántara-Curiel *et al.*, 2014; Bocanegras-Ibarias *et al.*, 2015; Tamayo-Legorreta *et al.*, 2016; González-Villoria *et al.*, 2016; Mancilla-Rojano *et al.*, 2019).

Por otro lado, también se han encontrado secuencias de inserción en aislados de *Acinetobacter* spp., las cuales le brindan una variabilidad genómica y en consecuencia les permite una mayor adaptación a nuevos nichos ecológicos (Gaiarsa *et al.*, 2019). Además, estas secuencias de inserción pueden desempeñar un papel importante en la sobreexpresión de genes de resistencia, tal es el caso con el hallazgo de IS*Aba48* río arriba de *bla*<sub>OXA-72</sub> en nuestros aislados. Este arreglo de genes podría estar influyendo en la transcripción de esta betalactamasa, lo que en consecuencia podría provocar un aumento en el nivel de resistencia hacia carbapenémicos y que coincidiría con los elevados valores de CMI que presentan las cepas de estudio (hasta 512 µg/mL) (Bahador *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2019; Yazdansetad *et al.*, 2019). No obstante, más estudios son necesarios para corroborar este fenómeno.

Otra clase de betalactamasas que han adquirido mayor relevancia en la actualidad por su amplio espectro de hidrólisis son las metalo-betalactamasas. Dentro de este grupo, NDM fue reportada por primera vez en 2008 en India, y fue identificada en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapénemicos (Yong *et al.*, 2009). Esta enzima confiere resistencia a todos los betalactámicos con excepción de monobactams. Se ha reportado su movilización en plásmidos, los cuales además de portar a esta enzima, son acarreadoras de otros determinantes de resistencia hacia otras familias de antibióticos, lo que en conjunto complica los tratamientos y recuperación de los pacientes (Ramírez *et al.*, 2020). Sólo las variantes NDM-1, NDM-2, NDM-3, NDM-5 y NDM-7 han sido reportadas en

aislados clínicos de *A. baumannii* en el mundo (Wu *et al.*, 2019; Khalid *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020). Interesantemente, en nuestro estudio encontramos a 9 cepas (AE22, AE23, AE27, AE29, AE30A, AE30B, AE38, AE44 y AE45) portando a esta betalactamasa en combinación con otras dos tipo OXA. A pesar de que en América Latina son escasos los reportes de esta betalactamasa en *A. baumannii* (Rodríguez *et al.*, 2017), en México existen dos reportes: uno en un aislado de *A. baumannii* y el otro en un aislado *A. haemolyticus* (Duran-Bedolla *et al.*, 2019; Bello-López *et al.*, 2019). Asimismo, en las 9 cepas portadoras de *bla*<sub>N<sup>DM</sup>-like</sub> se encontró a la secuencia de inserción IS*Aba125* flanqueando a esta betalactamasa lo cual coincide con otros reportes dónde éstas secuencias de inserción pueden conformar un transposón llamado Tn*125*, el cual moviliza a esta metalo-betalactamasa en diferentes géneros y especies bacterianas (Márquez-Ortiz *et al.*, 2017). No obstante, no fue posible enviar a secuenciar la betalactamasa ni el arreglo con IS*Aba125* debido al paro de actividades derivado de la contingencia sanitaria por SARS-Cov-2 que atraviesa nuestro país y el resto del mundo.

De igual manera encontramos en una cepa (AE19) acarreando al gen *bla*<sub>IMP-like</sub>, el primer reporte de esta metalo-betalactamasa fue en una cepa de *P. aeruginosa* resistente a imipenem aislada en Japón (Watanabe *et al.*, 1991), y es común encontrar a este gen dentro de un integrón de clase 1 el cual puede movilizarse por conjugación plasmídica (Ramírez *et al.*, 2020). Además, puede coexistir con otros genes de resistencia, como *bla*<sub>OXA</sub>, resultando en un incremento en la resistencia antibiótica (Zhao *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2018; Alcántar-Curiel *et al.*, 2019). En América Latina son pocos los reportes de esta carbapenemasa en *A. baumannii*, sólo ha sido reportada esporádicamente en algunos aislados clínicos en Brasil, mientras que en México su presencia en *Acinetobacter* spp. no ha sido confirmada hasta el momento (Rodríguez *et al.*, 2018). Curiosamente, en el mismo hospital de nuestro estudio se ha reportado la presencia de esta carbapenemasa en plásmidos de *P. aeruginosa* (López-García *et al.*, 2018), lo cual podría facilitar la adquisición de este gen en algún aislado de

*Acinetobacter* spp. Sin embargo, es necesario mandar a secuenciar este gen para verificar si se trata de la misma variante circulando en este hospital.

Si bien los campos pulsados nos mostraron que no se trataba de un brote en el hospital, pudimos observar pequeños grupos o clusters de cepas que presentaron relación genética entre sí, y que a pesar de que se encontraban distribuidas en 7 pulsotipos diferentes, sus fenotipos de resistencia no presentaron gran variabilidad entre ellas (**Anexo 1**). Numerosos estudios han demostrado que genes como *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-72</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>NDM</sub> se pueden movilizar por plásmidos en diferentes especies y géneros bacterianos por eventos de transferencia horizontal de genes (Da Silva *et al.*, 2016; Leungtonkam *et al.*, 2018). Curiosamente 20 cepas portadoras de *bla*<sub>OXA-72</sub>, presentaron una única banda plasmídica, lo cual podría sugerirnos la diseminación de esta carbapenemasa por medio de plásmidos en diferentes cepas en este hospital. Asimismo, pudimos observar que 9 cepas además de estar acarreando *bla*<sub>OXA-72</sub> también fueron portadoras de *bla*<sub>NDM-like</sub> lo que hasta el momento no ha sido reportado en *Acinetobacter* y que podría representar un riesgo para los pacientes de este hospital.

Otro mecanismo de resistencia no enzimático es la participación de bombas de eflujo. De las 6 familias de bombas descritas en *A. baumannii* la más importante y estudiada es la familia RND, debido a su amplio espectro de antibióticos que pueden expulsar (Leus *et al.*, 2018). Dentro de esta familia los sistemas más importantes descritos en *A. baumannii* son los sistemas de AdeABC, AdeFGH y AdeIJK (Temgoua *et al.*, 2019). La sobreexpresión de uno o varios sistemas puede disminuir la susceptibilidad hacia varios grupos de antibióticos, esto mediante mutaciones puntuales, deleciones o por secuencias de inserción en los componentes de regulación de cada sistema (Chen *et al.*, 2019).

En México sólo en un estudio realizado por Alcántara-Curiel *et al.* (2014) se ha reportado la participación de bombas en la resistencia de *A. baumannii* empleando un inhibidor (CCCP). Ellos reportaron un 14.5 y 31.6% de participación de bombas en la resistencia a meropenem e imipenem, respectivamente; mientras que en nuestro estudio empleando dos inhibidores reportamos una mayor actividad de

bombas de eflujo: 40% hacia meropenem y 60% hacia imipenem. Además, determinamos la participación de bombas de eflujo en la resistencia hacia aminoglucósidos y fluoroquinolonas, encontrando un 24% de participación de bombas para amikacina y 32% para ciprofloxacino. Cabe mencionar que de la familia RND sólo los sistemas AdeABC y AdeIJK se han asociado con resistencia a carbapenémicos, mientras que AdeABC y AdeFGH se asocian con la expulsión de aminoglucósidos, y para el caso de fluoroquinolonas los 3 sistemas se han asociado con su expulsión (Mullie *et al.*, 2016; Leus *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019).

Debido a que los dos inhibidores empleados tienen mecanismos de acción diferentes y pueden actuar sobre distintos sistemas de eflujo, se nos permite sugerir si una familia en específico como RND (al utilizar PA $\beta$ N), o que diferentes familias como RND, MATE, SMR y MFS, en conjunto (al utilizar CCCP) podrían estar involucradas en la resistencia hacia cierto antibiótico.

Por consiguiente, en la cepa AE16 pudimos observar que en presencia de CCCP el valor de la CMI para amikacina disminuyó hasta 16 veces, mientras que con PA $\beta$ N disminuyó sólo 4 veces, este resultado nos está indicando que probablemente no solamente bombas de la familia RND podrían estar involucradas en la resistencia hacia este antibiótico, sino que sistemas de otras familias, en conjunto, podrían estar jugando un papel muy importante en la resistencia hacia amikacina para esta cepa. De igual manera tuvimos 3 cepas (AE14, AE19 y AE50) que en presencia de CCCP hubo una disminución en el valor de la CMI, pero no mayor a lo reportado empleando a PA $\beta$ N como inhibidor, este dato nos permite inferir que probablemente sólo bombas de la familia RND participan en la resistencia hacia amikacina en este grupo de cepas. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar este dato.

Para el caso de ciprofloxacino observamos que en 4 cepas (AE14, AE16, AE22 y AE29) en presencia de CCCP disminuyó de 4 a 8 veces el valor de la CMI, mientras que con PA $\beta$ N disminuyó sólo 2 veces. Este dato nos sugiere que al igual que en el caso anterior, bombas de eflujo diferentes a las de la familia RND como los sistemas AbeS (SMR), AbeM (MATE) y AbaQ (MFS) podrían estar

participando en la expulsión de este antibiótico en este grupo de cepas (Pérez *et al.*, 2018; Temgoua *et al.*, 2019). Al igual que en el caso con amikacina, las cepas AE25 y AE40 mostraron una disminución en el valor de la CMI empleando CCCP, pero no mayor a la observado con PAβN, lo cual nos permite inferir que probablemente sólo sistemas de la familia RND podrían estar involucrados en la resistencia hacia ciprofloxacino en estas cepas.

Curiosamente para el caso de carbapenémicos al emplear PAβN como inhibidor pudimos observar una disminución de hasta 4 veces en el valor de la CMI, lo cual indica que sistemas de la familia RND podrían participar en la resistencia hacia este grupo de antibióticos. Sin embargo, al emplear CCCP como inhibidor no pudimos observar disminución alguna en el valor de la CMI, esto probablemente debido a la actividad de otros sistemas de eflujo de la familia RND que no se ven afectadas por este último inhibidor, pero que son capaces de expulsar estos antibióticos o que la concentración del inhibidor empleada no fue la suficiente para inhibir la actividad de las bombas y tendrían que hacerse estudios posteriores con mayor concentración como las reportadas anteriormente (Alcántara-Curiel *et al.*, 2014). De igual manera, también observamos que en 6 de nuestras cepas además de no disminuir el valor de la CMI para meropenem, lo incrementó. Este fenómeno ya ha sido observado en cepas de *K. pneumoniae* y se ha asociado con la reducción en la expresión de proteínas de membrana externa las cuales podrían estar influyendo en la resistencia hacia este grupo de antibióticos (Vera *et al.*, 2018); sin embargo, este estudio en *A. baumannii* es el primer reporte y se sugiere realizar más estudios para tratar de entender este fenómeno.

De manera general, las 25 cepas *A. baumannii* MDR presentaron un perfil de resistencia muy similar entre ellas (**Anexo 1**), mientras que el genotipo nos mostró 3 grupos de cepas diferentes, un grupo portador de 3 *bla*<sub>OXA</sub> diferentes (AE14, AE16 y AE19), otro grupo portador de *bla*<sub>OXA-72</sub> y *bla*<sub>NDM-like</sub> (AE22, AE23, AE27, AE29, AE30A, AE30B, AE38, AE44 y AE45) y un tercer grupo portador sólo de *bla*<sub>OXA-72</sub> (AE25, AE26, AE28, AE31, AE32, AE34, AE37, AE40, AE41, AE47, AE48, AE50 y AE51) lo que ayuda a explicar los diferentes pulsotipos encontrados por campos

pulsados. De igual manera, al encontrar el arreglo IS*Aba125-bla*<sub>NDM-like</sub> en cepas de diferentes pulstipos nos permite inferir que posiblemente esta betalactamasa podría estar movilizándose por medio de un transposón *Tn125* o *Tn125-like* en diferentes cepas circulantes en el hospital. Además, el hallazgo de IS*Aba48* río arriba de *bla*<sub>OXA-72</sub> y el haber localizado un segundo promotor proporcionado por la misma secuencia de inserción nos ayuda a entender un poco por qué estas cepas presentan valores de CMI tan elevados hacia carbapenémicos. No obstante, es necesario corroborar que IS*Aba48* realmente esté influyendo en la expresión de esta betalactamasa. Por último, pudimos observar cómo las bombas de expulsión juegan un papel muy importante en la adaptación de *A. baumannii* en diferentes nichos, por un lado, tuvimos cepas en las cuales las bombas de expulsión son importantes en la resistencia hacia ciertos grupos de antibióticos (como las cepas AE14, AE16, AE19, AE22, AE29, AE31, AE32 y AE40) mientras que en otras cepas no lo son (AE37), así como tuvimos cepas en las cuales las bombas de expulsión son importantes en el desarrollo del fenotipo MDR (AE14 y AE25). Asimismo, pudimos observar que, a pesar de tener múltiples sistemas de bombas de expulsión, no necesariamente todos van a participar en la resistencia antibiótica.

Con el surgimiento de las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) se han reducido los costos y tiempo para obtener la secuencia del genoma completo de un microorganismo de interés (Aguilar-Bullet *et al.*, 2015).

En este trabajo se consiguió secuenciar el genoma completo de la cepa *A. baumannii* AE38 resistente a todos los antibióticos probados. En el cromosoma de la cepa se localizaron genes de resistencia como *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>ADC-73</sub> que confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas de hasta tercera generación, respectivamente (Evans *et al.*, 2014; Karah *et al.*, 2017). Cabe mencionar que *bla*<sub>ADC-73</sub> puede conferir niveles de resistencia  $\geq 256$   $\mu\text{g/mL}$  a cefalosporinas lo que coincide con lo observado en esta cepa (Tsai *et al.*, 2020).

Por otro lado, se sabe que el mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas se debe principalmente a mutaciones en la región determinante de la resistencia a

quinolonas (QRDR) en los genes *gyrA* y *parC* en cepas de *A. baumannii* y miembros del complejo Acb (Gu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016). Asimismo, se ha reportado que sólo la mutación Ser83Leu en GyrA o la mutación Ser80Leu en ParC confieren niveles bajos de resistencia, mientras que en conjunto pueden conferir valores de CMI de hasta 256 µg/mL para este grupo de antibióticos (Tsai *et al.*, 2020) que coincide con los valores elevados de CMI que presentó esta cepa.

Esta cepa también fue portadora de un integrón similar a In439 reportado en el cromosoma de especies *A. baumannii* y se conforma de los casetes de genes *aac(6')-Ib* y *aadA1* en conjunto de *catB8* que confieren resistencia a gentamicina, amikacina, kanamicina, estreptomina, espectinomicina, y cloranfenicol respectivamente (Gordon *et al.*, 2010; Khurshid *et al.*, 2019). Además, contiene al gen *armA* que puede conferir niveles de resistencia de hasta 256 µg/mL para todos los aminoglucósidos con excepción de estreptomina y espectinomicina (Tsai *et al.*, 2020), lo cual coincide con lo encontrado en la CMI de esta cepa.

Asimismo, encontramos a *bla*<sub>OXA-72</sub> en un plásmido que tiene una estructura similar a otros plásmidos encontrados en cepas clínicas de *A. baumannii* en diferentes lugares del país. Esta enzima fue la carbapenemasa prevalente en todos los aislados de nuestro estudio y se asoció con siete pulsotipos diferentes con perfiles de resistencia muy similares entre sí. En el plásmido encontrado en esta cepa y los otros 3 con los que comparamos, muestran una región flanqueada por secuencias de inserción homólogas a las recombinasas XerC/XerD (**Figura 6**). Se ha sugerido que la presencia de sitios de reconocimiento a recombinasas XerC/XerD, flanqueando a esta betalactamasa, podrían estar participando en la movilización de *bla*<sub>OXA-72</sub> entre especies del género *Acinetobacter* (Povilonis *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2020). Y por otro lado, debido a eventos de recombinación genética mediados por sitios homólogos a proteínas Xer, podría ser que diferentes plásmidos se encuentren compartiendo regiones o estructuras genéticas que abarcan a esta betalactamasa (Kuo *et al.*, 2013).

Dentro de la misma región flanqueada por XerC/XerD en el plásmido de nuestra cepa pudimos localizar a la secuencia de inserción IS*Aba48* río arriba de *bla*<sub>OXA-72</sub>. Varios reportes han demostrado que las secuencias de inserción pueden jugar un papel muy importante en la resistencia a los antibióticos ya que pueden proveer de promotores fuertes al insertarse y en consecuencia aumentar el nivel de expresión de la betalactamasa (Pagano *et al.*, 2016). No obstante, a diferencia de otros estudios que reportan un promotor -10 extendido debido a la inserción de IS*Aba1* (Segal *et al.*, 2007; Corvec *et al.*, 2007; Kuo *et al.*, 2014), en nuestra cepa encontramos que IS*Aba48* en lugar de extender el promotor -10 de la betalactamasa dispuso de un segundo promotor río arriba del primero (**Figura 6**), lo cual podría estar favoreciendo en un aumento de la expresión de la betalactamasa y en consecuencia un aumento en el nivel de resistencia que correlaciona con los elevados valores de CMI's hacia antibióticos carbapenémicos que presenta esta cepa.

Por otro lado, esta cepa había sido identificada como portadora de *bla*<sub>NDM-like</sub>, no obstante, no fue posible encontrarla en la secuenciación masiva del genoma, por lo que se piensa que posiblemente estén coexistiendo dos poblaciones de *A. baumannii* y la que se logró secuenciar fue aquella no portadora de esta metalo-betalactamasa, por lo que sería adecuado volver a mandar a secuenciar obteniendo la cepa a partir de un cultivo con antibióticos carbapenémicos.

Al igual que en otras bacterias Gramnegativas, el desarrollo de multidrogo-resistencia en *A. baumannii* involucra la sobreexpresión de sistemas de bombas de eflujo, especialmente aquellas pertenecientes a la familia RND (Lee *et al.*, 2017). Generalmente, estos sistemas se encuentran en operones, donde el primer gen corresponde a una proteína de fusión de membrana (AdeA, AdeF y AdeI) la cual permite la interacción entre los otros dos componentes, el segundo codifica para el transportador RND (AdeB, AdeG y AdeJ) el cual se encarga del transporte y reconocimiento del sustrato, y por último el tercer gen se trata de un factor de membrana externa (AdeC, AdeH y AdeK) que constituirá un canal para el cruce del sustrato hacia el exterior celular (Leus *et al.*, 2018). En nuestra cepa

podimos encontrar homólogos a componentes de los 3 principales sistemas (AdeABC, AdeFGH y AdeIJK) y sus reguladores. Algunos estudios han mostrado que sustituciones aminoacídicas, inserción de secuencias como IS*Aba1* o la delección de estos reguladores en aislados clínicos resultan en una sobreexpresión de estos sistemas (Xu *et al.*, 2019). La proteína AdeL se encarga de regular al sistema AdeFGH, en el artículo de Coyne *et al.* en 2011 reportaron que la delección de 11 residuos aminoacídicos en el C-terminal o las sustituciones Thr319Lys y Val139Gly en el dominio de reconocimiento pueden conferir un incremento en la expresión de *adeG*; sin embargo, en nuestra cepa no se encontraron estas modificaciones (**Anexo 7**) lo que pone en duda la participación de este sistema en la resistencia.

AdeIJK es otro sistema de la familia RND que ha sido encontrado tanto en cepas *A. baumannii* sensibles como resistentes, su expresión se encuentra regulada por el regulador transcripcional AdeN de la familia TetR, y esta bomba puede conferir resistencia intrínseca hacia diferentes antibióticos como betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, entre otros más (Xu *et al.*, 2019). Algunos estudios han demostrado que la delección parcial o total de AdeN debido a un codón de paro prematuro incrementa la expresión de *adeJ* (Rosenfeld *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2020), en el caso de nuestra cepa no se localizó ningún codón de paro prematuro, pero sí sustituciones aminocídicas (Val217Asn, His215Asp, Gly213Val, Lys212Ser y Leu211Phe) debido la inserción de IS*Aba1* (**Anexo 11**). Hasta el momento no existen reportes de mutaciones en AdeN asociadas con la sobreexpresión de AdeIJK, por lo que no se puede descartar que estos cambios aminoacídicos podrían estar involucrados en una sobreexpresión de la bomba de expulsión.

De los 3 sistemas principales de la familia RND en *A. baumannii*, el sistema AdeABC ha sido el más estudiado debido al amplio espectro de antibióticos que puede expulsar (Abdi *et al.*, 2020). En nuestra cepa pudimos encontrar los homólogos a sus componentes, con excepción del sistema regulador AdeRS. Diferentes mutaciones en estos reguladores se han asociado con una sobreexpresión de *adeB* (Salehi *et al.*, 2020), en cambio la delección o pérdida de

este sistema regulador ha mostrado un incremento en la susceptibilidad antibiótica (Sun *et al.*, 2017). Por otro lado, Ming Feng *et al.*, mostró que otros sistemas reguladores, como *BaeSR*, también pueden regular la expresión de esta bomba de expulsión, por lo que es necesario más investigación para explorar el mecanismo de regulación de *AdeABC*, así como más evidencia directa de su papel en la resistencia antibiótica en aislados clínicos de *A. baumannii*. Por otro lado, encontramos varios cambios aminoacídicos (Gly306Val, Asn427Ser, Ala552Thr, Ala643Asp, Thr646Ser y Leu731Phe) en *adeB* de nuestra cepa con respecto a la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 sensible a los antibióticos (**Anexo 5**). Hasta el momento ningún estudio ha investigado si estos cambios aminoacídicos en el transportador RND (*adeB*) podrían estar relacionados con un incremento en el reconocimiento de sustratos y una mayor afinidad por ellos, lo que en consecuencia podría asociarse con el fenotipo MDR y los altos valores de CMI de la cepa.

Si bien, nosotros esperábamos que estos sistemas de la familia RND estuvieran involucrados en la resistencia en la cepa AE38, al realizar la inhibición con PA $\beta$ N sólo pudimos observar un fenotipo positivo para el antibiótico imipenem. Por lo que este dato nos sugiere que estos sistemas podrían no verse involucrados en la resistencia a los antibióticos evaluados (meropenem, amikacina y ciprofloxacino) o que la concentración empleada del inhibidor no fue la suficiente para inhibir a estos sistemas de eflujo, por lo cual es necesario evaluar concentraciones mayores del inhibidor, así como emplear otras metodologías (RT-qPCR) para corroborar o descartar la participación de estas bombas en la resistencia en esta cepa.

Cabe resaltar que también fueron localizadas otras bombas de familias diferentes como *AbeS* de la familia SMR y *AbeM* de la familia MATE que pueden expulsar antibióticos betalactámicos y fluoroquinolonas; *AbaQ*, *AmvA* y *Tet(b)* de la familia MFS que están involucrados en la expulsión de fluoroquinolonas, cloranfenicol y tetraciclinas respectivamente (Mullie *et al.*, 2016). Sin embargo, no nos fue posible evaluar la participación o no de estos sistemas en la resistencia empleando el

inhibidor CCCP. De igual manera, se logró localizar al sistema EmrAB-TolC de la familia MFS que está asociado con la resistencia a carbapenémicos y aminoglucósidos (Nowak *et al.*, 2016), y es importante mencionar que no se ve afectado por ninguno de los dos inhibidores empleados en este estudio, lo que sugiere otro factor a considerar en la resistencia antibiótica en esta cepa (Greene *et al.*, 2018).

## 9. CONCLUSIONES

Este estudio mostró que la resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *A. baumannii* en este hospital se encuentra mediada por varios mecanismos de resistencia. La resistencia a antibióticos carbapenémicos en los aislados del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, no fue debida sólo a la producción de diferentes carbapenemasas, sino que otros mecanismos como las bombas de expulsión, probablemente no sólo de una familia en particular, pueden ser responsables de la resistencia y del fenotipo MDR; lo cual le proporciona a este patógeno una estrategia exitosa para su adaptación y supervivencia en el ambiente hospitalario complicando los tratamientos en los pacientes.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Continuar con el monitoreo epidemiológico y molecular en los hospitales de Puebla para vigilar el surgimiento de especies *baumannii* y no-*baumannii* causantes de infecciones que puedan diseminar genes de resistencia a los antibióticos.
2. Amplificar el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> a las 9 cepas del complejo *Acb* faltantes.
3. Secuenciar los genes *bla*<sub>NDM-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>IMP-like</sub> y el arreglo *ISAb125-bla*<sub>NDM-like</sub> que portan las cepas.

4. Determinar los entornos genéticos de las betalactamasas encontradas y compararlos con otros entornos de cepas de la misma especie aisladas de diferentes ambientes.
5. Investigar si la segunda secuencia promotora proporcionada por IS*Aba48* río arriba de *bla*<sub>OXA-72</sub> influye en la expresión de esta betalactamasa incrementando los niveles de resistencia hacia antibióticos carbapenémicos.
6. Probar diferentes concentraciones de ambos inhibidores de bombas de expulsión para corroborar o descartar la participación de éstas en la resistencia a los antibióticos.
7. Investigar si los sistemas *adeABC*, *adeIJK*, *abeM* y *ermAB-toIC* participan en la resistencia a antibióticos carbapenémicos.
8. Investigar si la delección y/o mutaciones en los reguladores *adeRS*, *adeL* y *adeN* reportados en este estudio pudieran estar participando en la sobreexpresión de bombas de expulsión.
9. Investigar si los cambios aminoacídicos encontrados en el transportador RND *adeB* participan en el reconocimiento y en la resistencia a los antibióticos.
10. Caracterizar los plásmidos que portan el resto de las cepas *A. baumannii* MDR de este estudio.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., ... & Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infection and drug resistance*, 13, 423.
- Aguilar-Bultet, L., Falquet, L., (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Rev. Salud Anim.* 37-2, 25-132.

- Akrami, F., & Namvar, A. E. (2019). *Acinetobacter baumannii* as Nosocomial Pathogenic Bacteria. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 34(2), 84-96.
- Al-Hassan, L. L., & Al-Madboly, L. A. (2020). Molecular characterisation of an *Acinetobacter baumannii* outbreak. *Infection Prevention in Practice*, 2(2), 100040.
- Alcántar-Curiel, M. D., García-Torres, L. F., González-Chávez, M. I., Morfín-Otero, R., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M. D., ... & Santos-Preciado, J. I. (2014). Molecular mechanisms associated with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Mexico. *Archives of medical research*, 45(7), 553-560.
- Alcántar-Curiel, M. D., Rosales-Reyes, R., Jarillo-Quijada, M. D., Gayosso-Vázquez, C., Fernández-Vázquez, J. L., Toledano-Tableros, E., ... & Morfín-Otero, R. (2019). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Three Tertiary Care Hospitals in Mexico: Virulence Profiles, Innate Immune Response and Clonal Dissemination. *Frontiers in microbiology*, 10, 2116.
- Almasaudi, S. B. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi journal of biological sciences*, 25(3), 586-596.
- Aly, M., Tayeb, H. T., Al Johani, S. M., Alyamani, E. J., Aldughaisheem, F., Alabdulkarim, I., & Balkhy, H. H. (2014). Genetic diversity of OXA-51-like genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(7), 1223-1228.
- Asif, M., Alvi, I. A., & Rehman, S. U. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and drug resistance*, 11, 1249.
- Bahador, A., Raoofian, R., Pourakbari, B., Taheri, M., Hashemizadeh, Z., & Hashemi, F. B. (2015). Genotypic and antimicrobial susceptibility of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: analysis of IS*Aba* elements and *bla*OXA-23-like genes including a new variant. *Frontiers in microbiology*, 6, 1249.
- Bello-López, E., Castro-Jaimes, S., Cevallos, M. A., Rocha-Gracia, R. D. C., Castaneda-Lucio, M., Sáenz, Y., ... & Lozano-Zarain, P. (2019). Resistome and a Novel *bla* NDM-1-Harboring Plasmid of an *Acinetobacter haemolyticus* Strain from a Children's Hospital in Puebla, Mexico. *Microbial Drug Resistance*, 25(7), 1023-1031.
- Bello-López, E., del Carmen Rocha-Gracia, R., 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*.
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P. D., Villa, L., Nordmann, P., & Carattoli, A. (2010). Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10), 4168-4177.

- Blanco, P., Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., Martínez, J. L., & Alcalde-Rico, M. (2018). The development of efflux pump inhibitors to treat Gram-negative infections. *Expert opinion on drug discovery*, 13(10), 919-931.
- Bocanegra-Ibarias, P., Pena-López, C., Camacho-Ortiz, A., Llaca-Díaz, J., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., ... & Garza-González, E. (2015). Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *International journal of antimicrobial agents*, 45(3), 309-313.
- Brasiliense, D. M., Lima, K. V. B., Pérez-Chaparro, P. J., Mamizuka, E. M., de Oliveira Souza, C., Dutra, L. M. G., & McCulloch, J. A. (2019). Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter pittii* carrying the *blaOXA-72* gene in the Amazon region, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 93(1), 82-84.
- Brovedan, M. A., Cameranesi, M. M., Limansky, A. S., Morán-Barrio, J., Marchiaro, P., & Repizo, G. D. (2020). What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus?. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 1-15.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2).
- Centers for Disease Control and Prevention (US). (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services.
- Chen, Y., Ai, L., Guo, P., Huang, H., Wu, Z., Liang, X., & Liao, K. (2018). Molecular characterization of multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from pediatric intensive care unit in a Chinese tertiary hospital. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 614.
- Corvec, S., Poirel, L., Naas, T., Drugeon, H., & Nordmann, P. (2007). Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *blaOXA-23* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(4), 1530-1533.
- Cosgaya, C., Marí Almirall, M., Van Assche, A., Fernández-Orth, D., Mosqueda, N., Telli, M., ... & Roca, I. (2016). *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a new member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016.
- Coyne, S., Courvalin, P., & Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3), 947-953.
- Da Silva, G. J., & Domingues, S. (2016). Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 4(3), 29.

- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2009). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and environments*, 1103150282-1103150282.
- Duran-Bedolla, J., Bocanegra-Ibarias, P., Silva-Sanchez, J., Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Hernández-Castro, R., ... & Barrios-Camacho, H. (2019). Genetic characterization of multiple NDM-1-producing clinical isolates in Mexico. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 94(2), 195-198.
- Durmaz, R., Otlu, B., Koksall, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y., ... & Caliskan, A. (2009). The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis*, 62(5), 372-7.
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. (2014). OXA  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 27(2), 241-263.
- Ewers, C., Klotz, P., Leidner, U., Stamm, I., Prenger-Berninghoff, E., Göttig, S., ... & Scheufen, S. (2017). OXA-23 and ISAb<sub>1</sub>-OXA-66 class D  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *International journal of antimicrobial agents*, 49(1), 37-44.
- Facciola, A., Pellicanò, G. F., Visalli, G., Paolucci, I. A., Venanzi Rullo, E., Ceccarelli, M., ... & La Fauci, V. (2019). The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(3), 1266-1278.
- Fernández-Orth, D., Cosgaya, C., Telli, M., Mosqueda, N., Marí-Almirall, M., Roca, I., & Vila, J. (2017). Draft Genome Sequence of JVAP01T, the Type Strain of the Novel Species *Acinetobacter dijkshoorniae*. *Genome announcements*, 5(2).
- Fonseca, E. L., Scheidegger, E., Freitas, F. S., Cipriano, R., & Vicente, A. C. P. (2013). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*OXA-23 gene. *BMC microbiology*, 13(1), 245.
- Fonseca, É. L., Caldart, R. V., Freitas, F. S., Morgado, S. M., Rocha, L. T., Dos Santos, R. C., & Vicente, A. C. P. (2020). Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying *bla*OXA-72 and *bla*CTX-M-115 in the Brazilian Amazon region. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 18-21.
- Gaiarsa, S., Bitar, I., Comandatore, F., Corbella, M., Piazza, A., Scaltriti, E., ... & Migliavacca, R. (2019). Can Insertion Sequences Proliferation Influence Genomic Plasticity? Comparative Analysis of *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 78, a Persistent Clone in Italian Hospitals. *Frontiers in microbiology*, 10, 2080.
- Garnacho-Montero, J., Dimopoulos, G., Poulakou, G., Akova, M., Cisneros, J. M., De Waele, J., ... & Zahar, J. R. (2015). Task force on management and prevention of *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Intensive care medicine*, 41(12), 2057-2075.

- Garnacho-Montero, J., & Timsit, J. F. (2019). Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Current opinion in infectious diseases*, 32(1), 69-76.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., ... & Velázquez-Acosta, C. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS one*, 14(3), e0209865.
- Geisinger, E., & Isberg, R. R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*, 11(2), e1004691.
- Gerner-Smidt, P. E. T. E. R., Tjernberg, I., & Ursing, J. (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of clinical microbiology*, 29(2), 277-282.
- Gonzalez-Villoria, A. M., & Valverde-Garduno, V. (2016). Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen. *Journal of pathogens*, 2016.
- Gordon, N. C., & Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 35(3), 219-226.
- Graña-Miraglia, L., Evans, B. A., López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Volkow-Fernández, P., ... & Castillo-Ramírez, S. (2020). Origin of OXA-23 Variant OXA-239 from a Recently Emerged Lineage of *Acinetobacter baumannii* International Clone V. *Msphere*, 5(1).
- Greene, N. P., Kaplan, E., Crow, A., & Koronakis, V. (2018). Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: a structural and functional perspective. *Frontiers in microbiology*, 9, 950.
- Gu, D. X., Hu, Y. J., Zhou, H. W., Zhang, R., & Chen, G. X. (2015). Substitutions of Ser83Leu in GyrA and Ser80Leu in ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter pittii*. *Microbial Drug Resistance*, 21(3), 345-351.
- Hasani, A., Sheikhalizadeh, V., Ahangarzadeh Rezaee, M., Rahmati-Yamchi, M., Hasani, A., Ghotaslou, R., & Goli, H. R. (2016). Frequency of aminoglycoside-modifying enzymes and ArmA among different sequence groups of *Acinetobacter baumannii* in Iran. *Microbial Drug Resistance*, 22(5), 347-353.
- Hopmans, T. E. M., Smid, E. A., Wille, J. C., van der Kooi, T. I. I., Koek, M. B. G., Vos, M. C., ... & de Greeff, S. C. (2020). Trends in prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in hospitals in the Netherlands: 10 years of national point-prevalence surveys. *Journal of Hospital Infection*, 104(2), 181-187.
- Hu, Y., Feng, Y., Qin, J., Zhang, X., & Zong, Z. (2019). *Acinetobacter chinensis*, a novel *Acinetobacter* species, carrying bla NDM-1, recovered from hospital sewage. *Journal of Microbiology*, 57(5), 350-355.

- Jawad, A., Hawkey, P. M., Heritage, J., & Snelling, A. M. (1994). Description of Leeds Acinetobacter Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important Acinetobacter spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *Journal of clinical microbiology*, 32(10), 2353-2358.
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C. R., ... & Lee, S. H. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 9654-9692.
- Jiang, N., Zhang, X., Zhou, Y., Zhang, Z., & Zheng, X. (2019). Whole-genome sequencing of an NDM-1-and OXA-58-producing Acinetobacter *towneri* isolate from hospital sewage in Sichuan Province, China. *Journal of global antimicrobial resistance*, 16, 4-5.
- June, C. M., Muckenthaler, T. J., Schroder, E. C., Klamer, Z. L., Wawrzak, Z., Powers, R. A., ... & Leonard, D. A. (2016). The structure of a doripenem-bound OXA-51 class D  $\beta$ -lactamase variant with enhanced carbapenemase activity. *Protein Science*, 25(12), 2152-2163.
- Karah, N., Jolley, K. A., Hall, R. M., & Uhlin, B. E. (2017). Database for the *ampC* alleles in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*, 12(5), e0176695.
- Kaur, A., & Singh, S. (2018). Prevalence of Extended Spectrum Betalactamase (ESBL) and Metallobetalactamase (MBL) producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from various clinical samples. *Journal of pathogens*, 2018.
- Khalid, S., Ahmad, N., Ali, S. M., & Khan, A. U. (2020). Outbreak of Efficiently Transferred Carbapenem-Resistant *bla*NDM-Producing Gram-Negative Bacilli Isolated from Neonatal Intensive Care Unit of an Indian Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 26(3), 284-289.
- Khurshid, M., Rasool, M. H., Siddique, M. H., Azeem, F., Naeem, M., Sohail, M., ... & Qamar, M. U. (2019). Molecular mechanisms of antibiotic co-resistance among carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(10), 899-905.
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1), 19-36.
- Krawczyk, B., Lewandowski, K., & Kur, J. (2002). Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Molecular and cellular probes*, 16(1), 1-11.
- Kumita, W., Saito, R., Sato, K., Ode, T., Chida, T., Okamura, N., ... & Koike, K. (2009). Molecular characterizations of carbapenem and ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas putida*. *Journal of infection and chemotherapy*, 15(1), 6-12.

- Kuo, S. C., Yang, S. P., Lee, Y. T., Chuang, H. C., Chen, C. P., Chang, C. L., ... & Fung, C. P. (2013). Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with new plasmid-borne *bla*<sub>OXA-72</sub> in Taiwan. *BMC infectious diseases*, 13(1), 1-7.
- Kuo, H. Y., Chang, K. C., Liu, C. C., Tang, C. Y., Peng, J. H., Lu, C. W., ... & Liou, M. L. (2014). Insertion sequence transposition determines imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*, 20(5), 410-415.
- La Scola, B., Gundi, V. A., Khamis, A., & Raoult, D. (2006). Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *Journal of clinical microbiology*, 44(3), 827-832.
- Lamut, A., Peterlin Mašič, L., Kikelj, D., & Tomašič, T. (2019). Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal Research Reviews*, 39(6), 2460-2504.
- Lee, S. Y., Shin, J. H., Kim, S. H., Shin, M. G., Suh, S. P., & Ryang, D. W. (2015). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based VITEK MS system for the identification of *Acinetobacter species* from blood cultures: comparison with VITEK 2 and MicroScan systems. *Annals of laboratory medicine*, 35(1), 62-68.
- 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.
- Leungtongkam, U., Thummeepak, R., Tasanapak, K., & Sitthisak, S. (2018). Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, 13(12), e0208468.
- Leus, I. V., Weeks, J. W., Bonifay, V., Smith, L., Richardson, S., & Zgurskaya, H. I. (2018). Substrate specificities and efflux efficiencies of RND efflux pumps of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, 200(13).
- Lin, M. F., & Lan, C. Y. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 2(12), 787.
- Liu, Y. H., Kuo, S. C., Lee, Y. T., Chang, I. C., Yang, S. P., Chen, T. L., & Fung, C. P. (2012). Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45(2), 108-112.
- López-Durán, P. A., Fonseca-Coronado, S., Lozano-Trenado, L. M., Araujo-Betanzos, S., Rugerio-Trujillo, D. A., Vaughan, G., & Saldaña-Rivera, E. (2020). Nosocomial transmission of extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* strains in a tertiary level hospital. *Plos one*, 15(4), e0231829.
- López-García, A., del Carmen Rocha-Gracia, R., Bello-López, E., Juárez-Zelocualtecal, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., ... & Jiménez-Flores, G. (2018).

Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. *Infection and drug resistance*, 11, 1523.

- Lukovic, B., Gajic, I., Dimkic, I., Kekic, D., Zornic, S., Pozder, T., ... & Ranin, L. (2020). The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in Serbia: emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-12.
- Lv, W., Zhang, X., Hou, M., Han, D., Li, Y., & Xiong, W. (2019). Draft genome sequence of an OXA-23, OXA-66, ADC-25 and TEM-1D co-producing *Acinetobacter baumannii* ST195 isolated from a patient with neonatal pneumonia in China. *Journal of global antimicrobial resistance*, 16, 1-3.
- Macfaddin, J. F., (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Argentina: Editorial Medica Panamericana, S.A.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Mancilla-Rojano, J., Castro-Jaimes, S., Ochoa, S. A., Bobadilla del Valle, M., Luna-Pineda, V. M., Bustos, P., ... & Cevallos, M. A. (2019). Whole-genome sequences of five *Acinetobacter baumannii* strains from a child with leukemia M2. *Frontiers in Microbiology*, 10, 132.
- Maravić, A., Skočibušić, M., Fredotović, Ž., Šamanić, I., Cvjetan, S., Knezović, M., & Puizina, J. (2016). Urban riverine environment is a source of multidrug-resistant and ESBL-producing clinically important *Acinetobacter* spp. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3525-3535.
- Marquez-Ortiz, R. A., Haggerty, L., Olarte, N., Duarte, C., Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J., ... & Valderrama, A. (2017). Genomic epidemiology of NDM-1-encoding plasmids in Latin American clinical isolates reveals insights into the evolution of multidrug resistance. *Genome biology and evolution*, 9(6), 1725-1741.
- Mateo-Estrada, V., Graña-Miraglia, L., López-Leal, G., & Castillo-Ramírez, S. (2019). Phylogenomics reveals clear cases of misclassification and genus-wide phylogenetic markers for *Acinetobacter*. *Genome biology and evolution*, 11(9), 2531-2541.
- McConnell, M. J., Actis, L., & Pachón, J. (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*, 37(2), 130-155.
- Mirshekar, M., Shahcheraghi, F., Azizi, O., Solgi, H., & Badmasti, F. (2018). Diversity of class 1 integrons, and disruption of *carO* and *dacD* by insertion sequences among

*Acinetobacter baumannii* isolates in Tehran, Iran. *Microbial Drug Resistance*, 24(4), 359-366.

- Mitchell, J. M., & Leonard, D. A. (2014). Common clinical substitutions enhance the carbapenemase activity of OXA-51-like class D  $\beta$ -lactamases from *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(11), 7015-7016.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539.
- Mullié, C., Bouharkat, B., Guiheneuf, R., Serra, C., Touil-Meddah, A. T., & Sonnet, P. (2016). Efflux pumps in *Acinetobacter baumannii*: role in antibiotic resistance and interest of efflux pump inhibitors as additional therapeutic weapons. *Antimicrobial Research*, 6, 572-583.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., Deschaght, P., Passet, V., ... & Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov.(formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov.(formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in microbiology*, 162(4), 393-404.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., & Higgins, P. G. (2015). *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(3), 934-942.
- Nemec, A., Radolfová-Křížová, L., Maixnerová, M., Nemec, M., Clermont, D., Bzdil, J., ... & Španělová, P. (2019). Revising the taxonomy of the *Acinetobacter lwoffii* group: The description of *Acinetobacter pseudolwoffii* sp. nov. and emended description of *Acinetobacter lwoffii*. *Systematic and applied microbiology*, 42(2), 159-167.
- Nowak-Zaleska, A., Wieczór, M., Czub, J., Nierzwicki, Ł., Kotłowski, R., Mikucka, A., & Gospodarek, E. (2016). Correlation between the number of Pro–Ala repeats in the EmrA homologue of *Acinetobacter baumannii* and resistance to netilmicin, tobramycin, imipenem and ceftazidime. *Journal of global antimicrobial resistance*, 7, 145-149.
- Opazo-Capurro, A., San Martín, I., Quezada-Aguiluz, M., Morales-León, F., Domínguez-Yévenes, M., Lima, C. A., ... & González-Rocha, G. (2019). Evolutionary dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in Chilean hospitals. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 93-97.
- Pagano, M., Martins, A. F., & Barth, A. L. (2016). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian journal of microbiology*, 47(4), 785-792.

- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 538-582.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., & Barbé, J. (2018). Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(9).
- Périchon, B., Goussard, S., Walewski, V., Krizova, L., Cerqueira, G., Murphy, C., ... & Courvalin, P. (2014). Identification of 50 class D  $\beta$ -lactamases and 65 *Acinetobacter*-derived cephalosporinases in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(2), 936-949.
- Peterson, L. R. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 992-993.
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 24-38.
- Povilonis, J., Šeputienė, V., Krasauskas, R., Juškaitė, R., Miškinytė, M., Sužiedėlis, K., & Sužiedėlienė, E. (2013). Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1000-1006.
- Ramirez, M. S., Bonomo, R. A., & Tolmasky, M. E. (2020). Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. *Biomolecules*, 10(5), 720.
- Reza, A., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2019). Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) bacteria. *Antibiotics*, 8(4), 229.
- RHOVE, (2015). Informe Anual (RHOVE). México, Distrito Federal.
- Rodríguez, C. H., Nastro, M., & Famiglietti, A. (2018). Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Revista argentina de microbiología*, 50(3), 327-333.
- Rosenfeld, N., Bouchier, C., Courvalin, P., & Périchon, B. (2012). Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), 2504-2510.
- Salehi, B., Ghalavand, Z., Yadegar, A., & Eslami, G. (2020). Characteristics and diversity of mutations in regulatory genes of resistance-nodulation-cell division efflux pumps in association with drug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.
- Salmanov, A., Vozianov, S., Kryzhevsky, V., Litus, O., Drozdova, A., & Vlasenko, I. (2019). Prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial resistance in acute care hospitals in Kyiv, Ukraine. *Journal of Hospital Infection*, 102(4), 431-437.

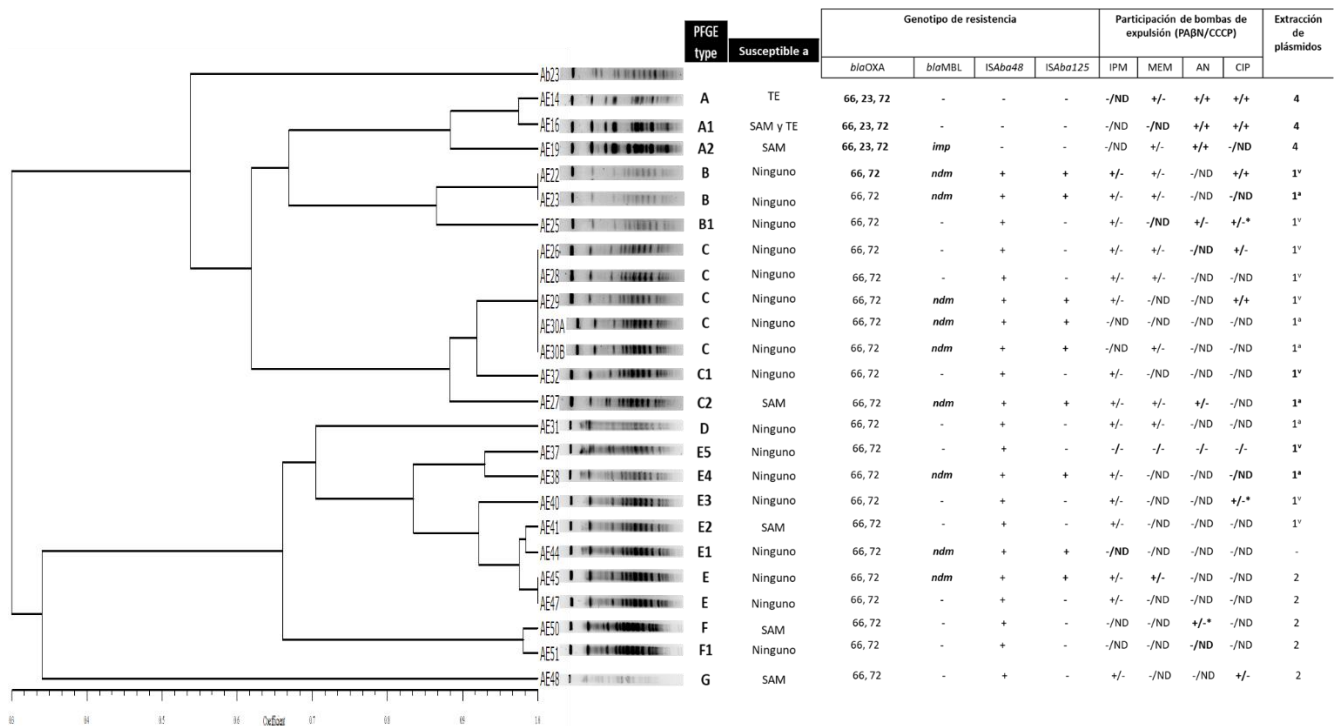
- Saranathan, R., Kumari, R., Kalaivani, R., Suresh, S., Rani, A., Purty, S., & Prashanth, K. (2017). Detection of IS*Aba1* in association with a novel allelic variant of the  $\beta$ -lactamase ADC-82 and class D  $\beta$ -lactamase genes mediating carbapenem resistance among the clinical isolates of MDR *A. baumannii*. *Journal of medical microbiology*, 66(2), 103-111.
- Šedo, O., Nemeč, A., Křížová, L., Kačalová, M., & Zdráhal, Z. (2013). Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*—*Acinetobacter baumannii* complex. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(8), 572-578.
- Segal, H., Jacobson, R. K., Garry, S., Bamford, C. M., & Elisha, B. G. (2007). Extended-10 promoter in IS*Aba1* upstream of *bla*<sub>OXA-23</sub> from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(8), 3040-3041.
- Singh, M., De Silva, P. M., Al-Saadi, Y., Switala, J., Loewen, P. C., Hausner, G., ... & Kumar, A. (2020). Characterization of Extremely Drug-Resistant and Hypervirulent *Acinetobacter baumannii* AB030. *Antibiotics*, 9(6), 328.
- Singkhom-in, U., & Chatsuwan, T. (2018). Mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* isolates from Thailand. *Journal of Medical Microbiology*, 67(12), 1667-1672.
- Smani, Y., Dominguez-Herrera, J., & Pachón, J. (2013). Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of infectious diseases*, 208(10), 1561-1570.
- Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., & Pachón, J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(3), 1806-1808.
- Sosa-Hernández, O., Matías-Téllez, B., Estrada-Hernández, A., Cureño-Díaz, M. A., & Bello-López, J. M. (2019). Incidence and costs of ventilator-associated pneumonia in the adult intensive care unit of a tertiary referral hospital in Mexico. *American journal of infection control*, 47(9), e21-e25.
- Sun, J. R., Jeng, W. Y., Perng, C. L., Yang, Y. S., Soo, P. C., Chiang, Y. S., & Chiueh, T. S. (2016). Single amino acid substitution Gly186Val in AdeS restores tigecycline susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1488-1492.
- Sun, J. R., Chiang, Y. S., Shang, H. S., Perng, C. L., Yang, Y. S., & Chiueh, T. S. (2017). Phenotype microarray analysis of the AdeRS two-component system in *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(12), 2343-2353.
- Tacconelli, E., Sifakis, F., Harbarth, S., Schrijver, R., van Mourik, M., Voss, A., ... & de Kraker, M. (2018). Surveillance for control of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), e99-e106.

- Tamayo-Legorreta, E., Turrubiarres-Martínez, E., Garza-Ramos, U., Nino-Moreno, P., Barrios, H., Sánchez-Pérez, A., ... & Silva-Sanchez, J. (2016). Outbreak Caused by *bla*<sub>OXA-72</sub>-Producing *Acinetobacter baumannii* ST417 Detected in Clinical and Environmental Isolates. *Microbial Drug Resistance*, 22(2), 129-133.
- Teixeira, A. B., Barin, J., Hermes, D. M., Barth, A. L., & Martins, A. F. (2017). PCR Assay Based on the *gyrB* Gene for Rapid Identification of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex at Specie Level. *Journal of clinical laboratory analysis*, 31(3), e22046.
- Temgoua, F. T. D., & Wu, L. (2018). Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. *Journal of Biosciences and Medicines*, 7(1), 48-70.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233.
- Tsai, Y. K., Liou, C. H., Lin, J. C., Fung, C. P., Chang, F. Y., & Siu, L. K. (2020). Effects of different mechanisms on antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: A strategic system for the screening and activity testing of new antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 105918.
- Ugolotti, E., Di Marco, E., Bandettini, R., Tripodi, G., & Biassoni, R. (2016). The whole genome sequencing of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains involved in suspected outbreak in an Intensive Care Unit of a pediatric hospital. *J Hosp Adm*, 5(6), 81.
- Vera-Leiva, A., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C. A., Villagra, N., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2018). The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 73-76.
- Villalón, P., Ortega, M., Sáez-Nieto, J. A., Carrasco, G., Medina-Pascual, M. J., Garrido, N., & Valdezate, S. (2019). Dynamics of a Sporadic Nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* Complex Population. *Frontiers in microbiology*, 10, 593.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(1), 147-151.
- Weber, B. S., Harding, C. M., & Feldman, M. F. (2016). Pathogenic *Acinetobacter*: from the cell surface to infinity and beyond. *Journal of bacteriology*, 198(6), 880-887.
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 409-447.

- Wong, M. H. Y., Chan, B., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2019). Over-expression of IS*Aba1*-linked intrinsic and exogenously acquired OXA type Carbapenem-Hydrolysing-Class D- $\beta$ -Lactamase-encoding genes is key mechanism underlying carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2809.
- Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM metallo- $\beta$ -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clinical microbiology reviews*, 32(2).
- Xu, C. F., Bilya, S. R., & Xu, W. (2019). *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New microbes and new infections*, 30, 100549.
- Yang, H., Hu, L., Liu, Y., Ye, Y., & Li, J. (2016). Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of chemotherapy*, 28(5), 443-445.
- Yazdansetad, S., Najari, E., Ghaemi, E. A., Javid, N., Hashemi, A., & Ardebili, A. (2019). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates carrying *bla*<sub>OXA</sub> genes with upstream IS*Aba1*: First report of a novel OXA subclass from Iran. *Journal of global antimicrobial resistance*, 18, 95-99.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, 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(12), 5046-5054.
- Yoon, E. J., Courvalin, P., & Grillot-Courvalin, C. (2013). RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 2989-2995.
- Zander, E., Chmielarczyk, A., Heczko, P., Seifert, H., & Higgins, P. G. (2013). Conversion of OXA-66 into OXA-82 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates and association with altered carbapenem susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 308-311.
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2011). IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Critical reviews in microbiology*, 37(3), 214-226.

## 12. ANEXOS

### Anexo 1. Características generales de 24 cepas *A. baumannii* MDR.



### Anexo 2. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *adeA* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeA* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

AE38	-----	0
ATCC17978	ATGCAAAAGCATCTTTTACTTCTTTATTTTTATCTATTGGGCTGATATTACAGGGGTGT	60
AE38	-----	0
ATCC17978	GATTCAAAAAAGTCGCTCAAGCTGAGCCACCACCGGCTAAAGTCAGTGTATTAAGCATT	120
AE38	-----	0
ATCC17978	CAACCGCAATCGGTAAATTTTAGTGAAAATCTTCTGCACGAGTACATGCGTTCCGTACG	180
AE38	-----	0
ATCC17978	GCGGAAATCCGTCCGCAAGTCGGAGGTATCATTGAAAAGGTTCTATTTAAACAAGGTAGT	240
AE38	-----	0
ATCC17978	GAAGTTAGAGCAGGGCAAGCCTTATATAAAAATTAATTCCGAGACTTTTGAGGCCGATGTA	300
AE38	-----	0
ATCC17978	AATAGCAATAGAGCTTCTCTCAATAAAGCTGAAGCTGAGGTGGCAAGACTCAAAGTTCAG	360
AE38	-----	0
ATCC17978	TTAGAACGTTATGAGCAGCTATTACCAAGTAATGCGATTAGTAAGCAAGAAGTAAGTAAT	420
AE38	-----ATGAAAGCATTGCTGGCC	18
ATCC17978	GCTCAAGCTCAGTATCGTCAGGCTCTAGCCGATGTCGCTCAAATGAAAGCATTGCTGGCC	480
	*****	
AE38	AGACAAAACCTTGAATCTGCAATATGCAACAGTTCGAGCGCCTATTTCTGGGCGTATTGGG	78
ATCC17978	AGACAAAACCTTGAATCTGCAATATGCAACAGTTCGAGCGCCTATTTCTGGGCGTATTGGG	540
	*****	
AE38	CAATCTTTTGTCACTGAAGGTGCATTGGTCGGTCAGGGCGATACCAATACGATGGCAACC	138
ATCC17978	CAATCTTTTGTCACTGAAGGTGCATTGGTCGGTCAGGGCGATACCAATACGATGGCAACC	600
	*****	
AE38	ATTCAACAGATTGATAAAGTCTATGTTGATGTTAAGCAATCGGTTAGTGAGTATGAACGC	198
ATCC17978	ATTCAACAGATTGATAAAGTCTATGTTGATGTTAAGCAATCGGTTAGTGAGTATGAACGC	660
	*****	
AE38	CTACAGGCTGCGCTACAAAGCGGCGAATTATCAGCAAATAGTGACAAAACCGTTCGTATT	258
ATCC17978	CTACAGGCTGCGCTACAAAGCGGCGAATTATCAGCAAATAGTGACAAAACCGTTCGTATT	720
	*****	
AE38	ACCAATAGCCACGGACAGCCCTATAACGTCACAGCAAAAATGTTGTTTGAAGATATTAAT	318
ATCC17978	ACCAATAGCCACGGACAGCCCTATAACGTCACAGCAAAAATGTTGTTTGAAGATATTAAT	780
	*****	
AE38	GTTGACCCGAAACAGGCGATGTCACATTCCGTATTGAAGTTAATAACACTGAACGAAAA	378
ATCC17978	GTTGACCCGAAACAGGCGATGTCACATTCCGTATTGAAGTTAATAACACTGAACGAAAA	840
	*****	
AE38	TTACTTCCGGGCATGTATGTGCGTGTCAATATTGATCGTGTCTATTCCCTCAAGCGCTA	438
ATCC17978	TTACTTCCGGGCATGTATGTGCGTGTCAATATTGATCGTGTCTATTCCCTCAAGCGCTA	900
	*****	

```

AE38          TTGGTTCCGGCGCAAGCGATCCAACGTAATATCAGTGGCGAGCCTCAGGTATATGTCAT  498
ATCC17978    TTGGTTCCGGCGCAAGCGATCCAACGTAATATCAGTGGCGAGCCTCAGGTATATGTCAT  960
*****

AE38          AACGCCCAAGGACACAGCGAAATTCGTCTATCGAAATGGACAGCAATATGAGCAGTTC  558
ATCC17978    AATGCCCAAGGTACACAGCGAAATTCGTCTATCGAAATGGACAGCAATATGAGCAGTTC  1020
** *****

AE38          TATATCGCTAACAAAGGCTTGAAAGTCGGTGACAGAGTCGTTGTTGAAGGTATTGAACGT  618
ATCC17978    TATATCGCTAACAAAGGCTTGAAAGTCGGTGACAGAGTCGTTGTTGAAGGTATTGAACGT  1080
*****

AE38          ATTAAGCCAAATCAAAAATTGGCATTGGCAGCATGGAAAGCACCAGCCGTGGCGAATCAT  678
ATCC17978    ATTAAGCCAAATCAAAAATTGGCATTGGCAGCATGGAAAGCACCAGCCGTGGCGAATCAT  1140
*****

AE38          GCTTCAAGTGTAGAAACCAAACCTTCTATACTGAGGGGGC----- 719
ATCC17978    GCTTCAAGTGTAGAAACCAAACCTTCTATACTGAGGGGGCGCAACCATGA 1191
*****

```

### Anexo 3. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *adeA* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeA* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          ----- 0
ATCC17978    MQKHLPLFLSIGLILQGCDKSKVAQAEPKPKVSVLSIQPQSVNFSENLPAHVHAFRT 60

AE38          ----- 0
ATCC17978    AEIRPQVGGIIEKVLFKQSEVRAGQALYKINSETFEADVNSNRASLNKAEAEVARLKVQ 120

AE38          -----MKALLARQNLNLQYATVRAPISGRIG 26
ATCC17978    LERYEQLLPSNAISKQEVSNQAQYRQALADVAQMKALLARQNLNLQYATVRAPISGRIG 180
*****

AE38          QSFVTEGALVGQDNTMATIQQIDKVYVDVKQSVSEYERLQAALQSGELSANSDKTVRI 86
ATCC17978    QSFVTEGALVGQDNTMATIQQIDKVYVDVKQSVSEYERLQAALQSGELSANSDKTVRI 240
*****

AE38          TNSHGQPYNVTAKMLFEDINVPETGDVTFRIEVNNTERKLLPGMYVRVNI DRASIPQAL 146
ATCC17978    TNSHGQPYNVTAKMLFEDINVPETGDVTFRIEVNNTERKLLPGMYVRVNI DRASIPQAL 300
*****

AE38          LVPAQAIQRNISGEPQVYVINAQGTAEIRPIEIGQQYEQFYIANKGLKVGDRVVVEGIER 206
ATCC17978    LVPAQAIQRNISGEPQVYVINAQGTAEIRPIEIGQQYEQFYIANKGLKVGDRVVVEGIER 360
*****

AE38          IKPNQKLALAANKAPAVANHASSVETKTSIAEGAQP 242
ATCC17978    IKPNQKLALAANKAPAVANHASSVETKTSITEGAQP 396
*****

```

### Anexo 4. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *adeB* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeB* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          ATGATGTCACAATTTTTTATTCGTCGTCGCCGTTTTTGGCTTGGGTTATTGCGATCTTCATT 60
ATCC17978    ATGATGTCACAATTTTTTATTCGTCGTCGCCGTTTTTGGCTTGGGTTATTGCGATCTTCATT 60
*****

AE38          ATTATATTTGGATTGCTGAGCATTCCTAAACTGCCAATTGCACGTTTTTCCAAGTGTGGCC 120
ATCC17978    ATTATATTTGGATTGCTGAGTATTCCTAAACTGCCAATTGCACGTTTTTCCAAGTGTAGCC 120
*****

AE38          CCGCCACAGGTGAATATTAGTGCGACTTATCCTGGTGCTACAGCTAAAACCATTAACGAT 180
ATCC17978    CCGCCACAGGTGAATATTAGTGCGACTTATCCTGGTGCTACAGCTAAAACCATTAACGAT 180
*****

AE38          AGCGTTGTAACCTTAATTGAGCGCAATTATCGGGTGTAATAAATCTACTCTACTATAGT 240
ATCC17978    AGCGTTGTAACCTTAATTGAGCGCAATTATCGGGTGTAATAAATCTACTCTACTATAGT 240
*****

AE38          GCGACAACAGATACCTCCGGTACAGCAGAGATTACGGCTACGTTTAAACCAAGCACAGAT 300
ATCC17978    GCGACAACAGATACCTCCGGTACAGCAGAGATTACGGCTACGTTTAAACCAAGCACAGAT 300
*****

AE38          GTGAAAATGGCTCAGGTTGACGTTCAAATAAAATCAAGGCTGTAGAAGCTCGCTTACCG 360
ATCC17978    GTGAAAATGGCTCAGGTTGACGTTCAAATAAAATCAAGGCTGTAGAAGCTCGCTTACCG 360
*****

AE38          CAAGTTGTACGTCAGCAAGGTTTACAGGTTGAGGCTTCATCGTCCGGATTTTAAATGCTG 420
ATCC17978    CAAGTTGTACGTCAGCAAGGTTTACAGGTTGAGGCTTCATCGTCCGGATTTTAAATGCTG 420
*****

AE38          GTCGGGATTAACTCTCAAATAATCAATATTCGGAAGTTGATTTGAGTGATTATTTGGTT 480
ATCC17978    GTCGGGATTAACTCTCAAATAATCAATATTCGGAAGTTGATTTGAGTGATTATTTGGTT 480
*****

AE38          CGAAATGTTGTAGAAGAGCTAAAACGTGTCGAAGGTGTAGGGAAGGTTCAATCTTTCGGT 540
ATCC17978    CGAAATGTTGTAGAAGAGCTAAAACGTGTCGAAGGTGTAGGGAAGGTTCAATCTTTCGGT 540
*****

AE38          GCCGAGAAAGCTATGCGTATTTGGGTCGACCCGAATAAGCTTGTTTCTTACGGTTTATCG 600
ATCC17978    GCCGAGAAAGCTATGCGTATTTGGGTCGACCCGAATAAGCTTGTTTCTTACGGTTTATCG 600
*****

AE38          ATTAGTGATGTGAATAATGCCATTCGTGAAAATAATGTCGAAATTGCACCCGCGCGACTT 660
ATCC17978    ATTAGTGATGTGAATAATGCCATTCGTGAAAATAATGTCGAAATTGCACCCGCGCGACTT 660
*****

AE38          GGTGATTTACCAGCTGAAAAAGCCAGCTCATACTATTCCATTGTCTGCTCAAGGGCAA 720
ATCC17978    GGTGATTTACCAGCTGAAAAAGCCAGCTCATACTATTCCATTGTCTGCTCAAGGGCAA 720
*****

AE38          TTGTCTAGTCTCGAGCAATTTAAAAATATTAGCTTAAAAAGTAAAACCTAACGGTAGCGTA 780
ATCC17978    TTGTCTAGTCTCGAGCAATTTAAAAATATTAGCTTAAAAAGTAAAACCTAACGGTAGCGTA 780
*****

AE38          ATTAAGTTATCTGATGTTGCCAATGTAGAAATAGGCTCACAGGCATATAACTTTGCCATT 840
ATCC17978    ATTAAGTTATCTGATGTTGCCAATGTAGAAATAGGCTCACAGGCATATAACTTTGCCATT 840
*****

AE38          TTGAAAATGGTAAGCCTGCTACCGCGGCTGCAATTCAATTAAGCCCGGGTGCTAACGCC 900
ATCC17978    TTGAAAATGGTAAGCCTGCTACCGCGGCTGCAATTCAATTAAGCCCGGGTGCTAACGCC 900

```

```

*****
AE38      GTGAAAAC T GCCGAAG T TGTTCGAGCAAAAATTGAAGA G TTGAAGCTAAATTTACCGGAA 960
ATCC17978 GTGAAAAC T GCCGAAG G TGTTCGAGCAAAAATTGAAGA A TTGAAGCTAAATTTACCGGAA 960
*****

AE38      GGCATGGAG TTTAGTATTCCCTTACGACAC C GCGCCGTTTGTCAAATTTCAATTGAAAAG 1020
ATCC17978 GGCATGGAA TTTAGTATTCCCTTACGACAC A GCGCCGTTTGTCAAATTTCAATTGAAAAG 1020
*****

AE38      GTAATTCATACATTACTTGAAGCCATGTTCTGGTTTT C ATTGTGATGTATCTATTTTTTA 1080
ATCC17978 GTAATTCATACATTACTTGAAGCCATGTTCTGGTTTT T ATTGTGATGTATCTATTTTTTA 1080
*****

AE38      CATAATGTCCGCTATACGCTTATTCAGCGATTGTGGCGCCTATTGCCTTACTCGGTACT 1140
ATCC17978 CATAATGTCCGCTATACGCTTATTCAGCGATTGTGGCGCCTATTGCCTTACTCGGTACT 1140
*****

AE38      TTTACCGTGATGTTGCTTGCCGGCTTTTCAATTAACGTACTCACCATGTT C GGTATGGT G 1200
ATCC17978 TTTACCGTGATGTTGCTTGCCGGCTTTTCAATTAACGTACTCACCATGTT T GGTATGGT A 1200
*****

AE38      CTTGCCATCGGGATTATTGTGCGACGATGC C ATTGT C GT G GTTGAAAACGTCGAAAGGATT 1260
ATCC17978 CTTGCCATCGGGATTATTGTGCGACGATGC A ATTGT T GT C GTTGAAAACGTCGAAAGGATT 1260
*****

AE38      ATGGCGAC A GAAGGATTAT C G CCTAAAGATGCAACCTCTAAAGCAATGAAAGAGATTACC 1320
ATCC17978 ATGGCGAC T GAAGGATTAA A T CCTAAAGATGCAACCTCTAAAGCAATGAAAGAGATTACC 1320
*****

AE38      AGCCCGATTATTGGTATTACGCTGGTATTGGCGGCAGTATTTTTACCTATGGCATTGCG 1380
ATCC17978 AGCCCGATTATTGGTATTACGCTGGTATTGGCGGCAGTATTTTTACCTATGGCATTGCG 1380
*****

AE38      AGTGGTTCTGTAGGGGTAATCTATAAACAGTTTACCTTGACCATGTGCGGTATCTATTTTA 1440
ATCC17978 AGTGGTTCTGTAGGGGTAATCTATAAACAGTTTACCTTGACCATGTGCGGTATCTATTTTA 1440
*****

AE38      TTTTCAGCGCTATTGGCACT T ATTTTAACACCGGCAC TTTGTGCCAC G ATTTTAA A ACCA 1500
ATCC17978 TTTTCAGCGCTATTGGCACT C ATTTTAACACCGGCAC TTTGTGCCAC A ATTTTAA A GCCA 1500
*****

AE38      ATCGATGGGCATCA C CAGAAGAAGGGCTTCTTTGCATGGTTTGACCGTAGTTTCGATAAA 1560
ATCC17978 ATCGATGGGCATCA T CAGAAGAAGGGCTTCTTTGCATGGTTTGACCGTAGTTTCGATAAA 1560
*****

AE38      GTCACTAAAAAGTATGAATTGATGCTGCTTAAAATCATCAAACATACAGTTCCAATGATG 1620
ATCC17978 GTCACTAAAAAGTATGAATTGATGCTGCTTAAAATCATCAAACATACAGTTCCAATGATG 1620
*****

AE38      GTGATCTTTTTAGTAATTACCGGTATTACCTTTA CCGGAATGAAATATTGGCCAACAGCA 1680
ATCC17978 GTGATCTTTTTAGTAATTACCGGTATTACCTTT G CCGGAATGAAATATTGGCCAACAGCA 1680
*****

AE38      TTTATGCCAGAGGAAGATCAAGG T TGGTTCATGACTTCGTTCCAGCTACCTTCAGATGCA 1740
ATCC17978 TTTATGCCAGAGGAAGATCAAGG C TGGTTCATGACTTCGTTCCAGCTACCTTCAGATGCA 1740
*****

AE38      ACCG C T GAGCGTACTCGGAATGTAGTCAATCAATTTGAAAATAATTTGAAAG A CAATCCC 1800
ATCC17978 ACCG C A GAGCGTACTCGGAATGTAGTCAATCAATTTGAAAATAATTTGAAAG A TAATCCC 1800
*****

```

AE38 GATGTAAAAAGTAATACCACCATTTGGGATGGGGTTTTAGTGGCGCAGGACAAAATGTA 1860  
 ATCC17978 GATGTAAAAAGTAATACCACCATTTGGGATGGGGTTTTAGTGGCGCAGGACAAAACGTA 1860  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GCTGTGGCTTTTACGACACTTAAAGACTTCAAAGAGCGGACTAGCTCTGCATCTAAGATG 1920  
 ATCC17978 GCTGTGGCTTTTACGACACTTAAAGACTTCAAAGAGCGGACTAGCTCTGCATCTAAGATG 1920  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ACAAGCGACGTTAATCTTCTATGGCGAACAGTACGGAAGGCGAGACTATGGCCGTATTA 1980  
 ATCC17978 ACAAGCGCCGTTAATACTTCTATGGCGAACAGTACGGAAGGCGAGACTATGGCCGTATTA 1980  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CCACCCGCTATTGATGAGTTAGGTACTTTTTTCAGGTTTCAGTTTACGTTTACAAGACCGC 2040  
 ATCC17978 CCACCCGCTATTGATGAGTTAGGTACTTTTTTCAGGTTTCAGTTTACGTTTACAAGACCGC 2040  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GCTAACTTAGGTATGCCTGCTTTACTGGCTGCTCAAGATGAACTTATGGCAATGGCAGCC 2100  
 ATCC17978 GCTAACTTAGGTATGCCTGCTTTACTGGCTGCTCAAGATGAACTTATGGCAATGGCAGCC 2100  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 AAGAATAAAAAGTTCTATATGGTTTGAATGAAGGGTTGCCACAAGGTGACAATATTTCT 2160  
 ATCC17978 AAGAATAAAAAGTTCTATATGGTTTGAATGAAGGGTTGCCACAAGGTGACAATATTTCT 2160  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TTA AAAAATTGACCGTGAAAAGCTTAGTGCACTTGGTGTTAAGTTTTCTGATGTTTCAGAC 2220  
 ATCC17978 TTA AAAAATTGACCGTGAAAAGCTTAGTGCACTTGGTGTTAAGTTTTCTGATGTTTCAGAC 2220  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ATCATTTCTACATCAATGGGTTCAATGTATATCAATGACTTCCCTAATCAAGGACGTATG 2280  
 ATCC17978 ATCATCTCTACATCAATGGGTTCAATGTATATCAATGACTTCCCTAATCAAGGACGTATG 2280  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CAACAAGTCATTGTACAAGTTGAGGCTAAATCACGTATGCAATTGAAAGATATCTTGAAT 2340  
 ATCC17978 CAACAAGTCATTGTACAAGTTGAGGCTAAATCACGTATGCAATTGAAAGATATCTTGAAT 2340  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CTGAAAGTCATGGGTTCAAGCGGTCAATTAGTCTCGTTATCAGAAGTTGTAACGCCACAA 2400  
 ATCC17978 CTGAAAGTCATGGGTTCAAGCGGTCAATTAGTCTCGTTATCAGAAGTTGTAACGCCACAA 2400  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TGAATAAGGCACCAACAATATAATCGTTATAACGGACGACCATCTTTGAGTATTGCT 2460  
 ATCC17978 TGAATAAGGCACCGCAACAATATAATCGTTATAACGGACGACCATCTTTGAGTATTGCT 2460  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GGTATTCCTAACTTCGATACGTCATCGGGTGAAGCAATGCGTGAAATGGAACAACCTGATT 2520  
 ATCC17978 GGTATTCCTAACTTCGATACGTCATCGGGTGAAGCAATGCGTGAAATGGAACAACCTGATT 2520  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GCGAAATTACCGAAAGGTATTGGCTACGAGTGGACAGGTATTCCTTACAGGAAAAGCAG 2580  
 ATCC17978 GCGAAATTACCGAAAGGTATTGGCTACGAGTGGACAGGTATTCCTTACAGGAAAAGCAG 2580  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TCTGAATCACAATGGCCTTTTTACTTGGTTTATCCATGTTAGTTGCTTTCCTTGTCTTG 2640  
 ATCC17978 TCTGAATCACAATGGCCTTTTTACTTGGTTTATCCATGTTAGTTGGTTTTTCCTTGTCTTG 2640  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GCTGCACTCTATGAAAGCTGGGCAATTCCACTTCTGTGATGCTAGTTGTGCCACTCGGT 2700  
 ATCC17978 GCTGCACTCTATGAAAGCTGGGCAATTCCACTTCTGTGATGCTAGTTGTGCCACTCGGT 2700  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ATTTTTGGAGCAATCATTGCCATTATGTCTAGGGGTTAATGAATGATGTGTCTTCAA 2760  
 ATCC17978 ATTTTTGGAGCAATCATTGCCATTATGTCTAGGGGTTAATGAATGATGTGTCTTCAA 2760

```

*****
AE38      ATCGGGCTAATTACCATTATTGGTCTATCGGCAAAGAATGCGATTTTGATTGTTGAATTT 2820
ATCC17978 ATCGGGCTAATTACCATTATTGGTCTATCGGCAAAGAATGCAATTTTGATTGTTGAATTT 2820
*****

AE38      GCGAAAATGCTGAAAGAAGAAGGCATGAGTTTGATTGAAGCCACTGTTGCGCAGCCAAA 2880
ATCC17978 GCGAAAATGCTGAAAGAAGAAGGCATGAGTTTGATTGAAGCCACTGTTGCTGCAGCCAAA 2880
*****

AE38      CTTCGCTTACGGCCAATCTGATGACATCACTTGCAATTTACGTGTGGTGTAAATTCCTTTG 2940
ATCC17978 CTTCGCTTACGGCCAATCTGATGACATCACTTGCAATTTACGTGTGGTGTAAATTCCTTTG 2940
*****

AE38      GTGATTGCCTCAGGTGCAAGTTCAGAACTCAACATGCTTTAGGCACAGGGGTTTTTGGC 3000
ATCC17978 GTGATTGCCTCAGGTGCAAGTTCAGAACTCAACATGCTTTAGGCACAGGGGTTTTTGGT 3000
*****

AE38      GGCATGATTTACGCCACCATTTCTGGCTATTTTCTTTGTTCCCGTGTTTTTTATCTTCATT 3060
ATCC17978 GGCATGATTTACGCCACTATTTCTGGCTATTTTCTTTGTTCCCGTGTTTTTTATCTTCATT 3060
*****

AE38      TTGGGTGCAGTAGAAAAGCTATTTTCTCTAAGAAAAAATCTCATCTTAA 3111
ATCC17978 CTGGGTGCAGTAGAAAAGCTATTTTCTCTAAGAAAAAATCTCATCTTAA 3111
*****

```

## Anexo 5. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *adeB* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeB* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

ATCC17978  MMSQFFIRRPVFAWVIAIFIIIFGLLSIPKLPPIARFPSVAPPQVNI SATYPGATAKTIND 60
AE38      MMSQFFIRRPVFAWVIAIFIIIFGLLSIPKLPPIARFPSVAPPQVNI SATYPGATAKTIND 60
*****

ATCC17978  SVVTLIERELSGVKNLLY SATDTSGTAEITATFKPGTDVEMAQVDVQNKIKAVEARLP 120
AE38      SVVTLIERELSGVKNLLY SATDTSGTAEITATFKPGTDVEMAQVDVQNKIKAVEARLP 120
*****

ATCC17978  QVVRQQGLQVEASSGFLMLVGINSPNNQYSEVDLS DYLVNRNVVEELKRVEGVGKVQSF 180
AE38      QVVRQQGLQVEASSGFLMLVGINSPNNQYSEVDLS DYLVNRNVVEELKRVEGVGKVQSF 180
*****

ATCC17978  AEKAMRIWVDPNKLVS YGLSISDVNNAIRENNVEIAPGRLGDLPAEKGLITIPLSAQGQ 240
AE38      AEKAMRIWVDPNKLVS YGLSISDVNNAIRENNVEIAPGRLGDLPAEKGLITIPLSAQGQ 240
*****

ATCC17978  LSSLEQFKNISLKSKTNGSVIKLSDVANVEIGSQAYNFAILENGKPATAAAIQLSPGANA 300
AE38      LSSLEQFKNISLKSKTNGSVIKLSDVANVEIGSQAYNFAILENGKPATAAAIQLSPGANA 300
*****

ATCC17978  VKTAEVVRAKIEELKLNLP EGMFESIPYDTAPFVKISIEKVIHTLLEAMVLFIVMYLFL 360
AE38      VKTAEVVRAKIEELKLNLP EGMFESIPYDTAPFVKISIEKVIHTLLEAMVLFIVMYLFL 360
*****

ATCC17978  HNVRYTLIPAI VAPIALLGTFVTMMLLAGFSINVLTMFGMVLAIGIIVDDAIVVVENVERI 420
AE38      HNVRYTLIPAI VAPIALLGTFVTMMLLAGFSINVLTMFGMVLAIGIIVDDAIVVVENVERI 420
*****

ATCC17978  MATEGLNPKDATSKAMKEITSPIIGITLVLA AVFLPMAFASGSVGVIIYKQFTLTMSVSIL 480

```

```

AE38      MATEGLSPKDATSKAMKEITSPIIGITLVLAAVFLPMAFASGSVGVVIYKQFTLTMSVSIL 480
          *****
ATCC17978 FSALLALILTPALCATILKPIDGHHQKKGFFAWFDRSFDKVTKKYELMLLKI IKHTVPMM 540
AE38      FSALLALILTPALCATILKPIDGHHQKKGFFAWFDRSFDKVTKKYELMLLKI IKHTVPMM 540
          *****
ATCC17978 VIFLVIITGITFAGMKYWPTAFMPEEDQGWFMSTFQLPSDATAERTRNVVNQFENNLKDNP 600
AE38      VIFLVIITGITFAGMKYWPTAFMPEEDQGWFMSTFQLPSDATAERTRNVVNQFENNLKDNP 600
          *****
ATCC17978 DVKSNTTILGWGFSGAGQNVAVAFITLTKDFKERTSSASKMTSAVNTSMANSTEGETMAVL 660
AE38      DVKSNTTILGWGFSGAGQNVAVAFITLTKDFKERTSSASKMTS DVNSSMANSTEGETMAVL 660
          *****
ATCC17978 PPAIDELGTFSGFSLRLQDRANLGMPELLAAQDELMAMAANKKFFYMWVNEGLPQGDNIS 720
AE38      PPAIDELGTFSGFSLRLQDRANLGMPELLAAQDELMAMAANKKFFYMWVNEGLPQGDNIS 720
          *****
ATCC17978 LKIDREKLSAIGVKFSDVSDIISTSMGSMYINDFPNQGRMQQVIVQVEAKSRMQLKDILN 780
AE38      LKIDREKLSAIGVKFSDVSDIISTSMGSMYINDFPNQGRMQQVIVQVEAKSRMQLKDILN 780
          *****
ATCC17978 LKVMGSSGQLVSLSEVVTPQWNKAPQQYNRYNGRPSLSIAGIPNFDTS SGEAMREMEQLI 840
AE38      LKVMGSSGQLVSLSEVVTPQWNKAPQQYNRYNGRPSLSIAGIPNFDTS SGEAMREMEQLI 840
          *****
ATCC17978 AKLPKGIGYEW TGISLQEKQSESQMAFLLGLSMLVVFLVLAALYESWAIPLSVMLV VPLG 900
AE38      AKLPKGIGYEW TGISLQEKQSESQMAFLLGLSMLVVFLVLAALYESWAIPLSVMLV VPLG 900
          *****
ATCC17978 IFGAI IAIMSRGLMNDVFFKIGLITIIIGLSAKNAILIVEFAKMLKEEGMSLIEATVAAAK 960
AE38      IFGAI IAIMSRGLMNDVFFKIGLITIIIGLSAKNAILIVEFAKMLKEEGMSLIEATVAAAK 960
          *****
ATCC17978 LRLRPILMTSLAFTCGVIPLVIASGASSETQHALGTGVFGGMISATILAIFFVPVFFIFI 1020
AE38      LRLRPILMTSLAFTCGVIPLVIASGASSETQHALGTGVFGGMISATILAIFFVPVFFIFI 1020
          *****
ATCC17978 LGAVEKLFSSKKKISS 1036
AE38      LGAVEKLFSSKKKISS 1036
          *****

```

**Anexo 6. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *adeL* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeL* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38      GTGGATCTATTTTCATGCCATGAGAGTATTCAACAAAGTTGTTGAAACAAATAGTTTCAGT 60
ATCC17978 GTGGATCTATTTTCATGCCATGAGAGTATTCAACAAAGTTGTTGAAACAAATAGTTTCAGT 60
          *****
AE38      TTAGCAGCTGATAGTTTGGGTCTACCGCGTGCTTCTGTGACCAACAACCATTCAGGCTTTA 120
ATCC17978 TTAGCAGCTGATAGTTTGGGTCTACCGCGTGCTTCTGTGACTACAACCATTCAGGCTTTA 120
          *****
AE38      GAGAAGCATTTC AAGTTCGATTGCTTAATCGGACAACACGAAAAATTAGTCTCACACCG 180

```

ATCC17978 GAGAAGCATTTC A CAAGTTCGATTGCTTAATCGGACAACACGAAAAATTAGTCTCACACCG 180  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GATGGCGCCGTATATTATGATCGGACAGCCCGTATTTTAGCGGATGTTGCCGATATTGAA 240  
 ATCC17978 GATGGCGCCGTATATTATGATCGGACAGCCCGTATTTTAGCGGATGTTGCCGATATTGAA 240  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TCTTCTTTTCATGATGCAGAGCGGGGGCCAAGAGGTCAGCTTCGTATTGATGTGCCTGTA 300  
 ATCC17978 TCTTCTTTTCATGATGCAGAGCGGGGGCCAAGAGGTCAGCTTCGTATTGATGTGCCTGTA 300  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TCGATTGGACGTTTAATTTTAATTTCCAAGGTCGCGATTTCATGCACGCTATCCTGAT 360  
 ATCC17978 TCGATTGGACGTTTAATTTTAATTTCCAAGGTCGCGATTTCATGCACGCTATCCTGAT 360  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ATTGATTTAGTAATTGGTCTGAACGACCGACCTGTAGATTTGGTTGGAGAAGCTGTTGAT 420  
 ATCC17978 ATTGATTTAGTAATTGGTCTGAACGACCGACCTGTAGATTTGGTTGGAGAAGCTGTTGAT 420  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TGTGCAATTCGGGTGGGTGAATTTAAAGATTCAAGCTTAATTGCGCGTCGTATCGGAACT 480  
 ATCC17978 TGTGCAATTCGGGTGGGTGAATTTAAAGATTCAAGCTTAATTGCGCGTCGTATCGGAACT 480  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TTCCAGTGTGCAACCGCTGCTTCACCGATTTATTTAGAAAAATATGGCGAACCTACCTCA 540  
 ATCC17978 TTCCAGTGTGCAACCGCTGCTTCACCGATTTATTTAGAAAAATATGGCGAACCTACCTCA 540  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ATTGAAGATTTGCAAAAAAATCATAAAGCGATTTCATTTCTTTTCAAGCCGTACCGGACGC 600  
 ATCC17978 ATTGAAGATTTGCAAAAAAATCATAAAGCGATTTCATTTCTTTTCAAGCCGTACCGGACGC 600  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 AACTTCGATTGGGACTTTGTGGTTGATGATTTAATTTAAAGTGTGTCAGTACGTGGACGT 660  
 ATCC17978 AACTTCGATTGGGACTTTGTGGTTGATGATTTAATTTAAAGTGTGTCAGTACGTGGACGT 660  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GTTTCGGTAAATGACGGTGATGCTTATATCGACTTGGCTTTGCAAGGTTTTGGTATAAAT 720  
 ATCC17978 GTTTCGGTAAATGACGGTGATGCTTATATCGACTTGGCTTTGCAAGGTTTTGGTATAAAT 720  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CAAGGCCACGTTATATGCTCACCAACCATTTAGAATCAGGTTTGTTAAAGAGGTATTG 780  
 ATCC17978 CAAGGCCACGTTATATGCTCACCAACCATTTAGAATCAGGTTTGTTAAAGAGGTATTG 780  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CCTCAGTGGACGCCAGCACCGATGCCGATTTTACGAGTTTATCTTCAAATCGTCATTTA 840  
 ATCC17978 CCTCAGTGGACGCCAGCACCGATGCCGATTTTACGAGTTTATCTTCAAATCGTCATTTA 840  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TCGCTTAAAGTAAAAGTGTGTTGTTGATTGGGTCGCTGAACTTTTTGCAGGCTGTCCATTA 900  
 ATCC17978 TCGCTTAAAGTAAAAGTGTGTTGTTGATTGGGTCGCTGAACTTTTTGCAGGCTGTCCATTA 900  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CTTGGCGGTACAGCTTTACCTTTTCGACCAGAAATGTGAATTTGCCTGTGATAAAGAACT 960  
 ATCC17978 CTTGGCGGTACAGCTTTACCTTTTCGACCAGAAATGTGAATTTGCCTGTGATAAAGAACT 960  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GGTCATGAATATACAATTCGTACTTTGGTCGAGCAGCATAAATATTGCTGAAGCTTATACG 1020  
 ATCC17978 GGTCATGAATATACAATTCGTACTTTGGTCGAGCAGCATAAATATTGCTGAAGCTTATACG 1020  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CTCAAAACCTTAA 1032  
 ATCC17978 CTCAAAACCTTAA 1032  
 \*\*\*\*\*

## Anexo 7. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *adeL* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeL* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          MDLFHAMRVFNKVVETNSFSLAADSLGLPRASVTTTIIQALEKHLQVRLNRTTRKISLTP 60
ATCC17978    MDLFHAMRVFNKVVETNSFSLAADSLGLPRASVTTTIIQALEKHLQVRLNRTTRKISLTP 60
*****

AE38          DGAVYYDR TARILADVADIESSFHDAERGPRGQLRIDVPVSI GRLILIPRLRDFHARYPD 120
ATCC17978    DGAVYYDR TARILADVADIESSFHDAERGPRGQLRIDVPVSI GRLILIPRLRDFHARYPD 120
*****

AE38          IDLVIGLNDRPVDLVGEAVDCAIRV GELKDSSLIARRIGTFQCATAASPIYLEKYGEPTS 180
ATCC17978    IDLVIGLNDRPVDLVGEAVDCAIRV GELKDSSLIARRIGTFQCATAASPIYLEKYGEPTS 180
*****

AE38          IEDLQKNHKAIHFFSSRTGRNFDWDFVVDLIKSVSVRGRVSVNDGDAYIDLALQGFGII 240
ATCC17978    IEDLQKNHKAIHFFSSRTGRNFDWDFVVDLIKSVSVRGRVSVNDGDAYIDLALQGFGII 240
*****

AE38          QGPRYMLTNHLESGLLKEVLPQWTPAPM PISAVYLQNRHLSLKVVFVDWVAELFAGCPL 300
ATCC17978    QGPRYMLTNHLESGLLKEVLPQWTPAPM PISAVYLQNRHLSLKVVFVDWVAELFAGCPL 300
*****

AE38          LGGTALPFDQKCEFACDKETGHEYTIR T LVEQHNI AEAYTLKT 343
ATCC17978    LGGTALPFDQKCEFACDKETGHEYTIR T LVEQHNI AEAYTLKT 343
*****

```

## Anexo 8. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *adeG* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeG* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          ATGAATATTTCTAAA TTTTTTAT TGATCGGCCGATCTTTGCTGGTGTGC TATCAGTCTTG 60
ATCC17978    ATGAATATTTCTAAG TTTTTTAT TGATCGGCCGATCTTTGCTGGTGT TT TATCAGTATTG 60
*****

AE38          ATTTTACTCGCCGGTCTCCTTTCGGTATTTCAGTTACCGATTCTGAATATCCCAGGTT 120
ATCC17978    ATTTTACTCGCCGGTCTGCTTTCGGTATTCCAATTACCGATTCTGAATATCCCAGGTT 120
*****

AE38          GTTCCACCATCTGTGGTGGTACGTGCCCAATATCCGGGTGCAAACCCAAAAGTGATTGCT 180
ATCC17978    GTTCCACCATCTGTGGTGGTACCGGCCCAATATCCGGGTGCAAACCCAAAAGTGATTGCT 180
*****

AE38          GAAACGGTTGCTTCTCCGCTCGAAGAGTCAATCAACGGCGTCGAAGACATGCTGTATATG 240
ATCC17978    GAAACGGTTGCA TCTCCGCTCGAAGAGTCAATCAACGGCGTCGAAGACATGCTGTATATG 240
*****

AE38          CAATCTCAAGCAAACAGCGACGGTAA TTAACCATTACGGTGAAC TTTAACTCGGTATC 300

```

ATCC17978 CAATCTCAAGCAAACAGCGACGGTAACTAACCATTACGGTGAACTTTAACTCGGTATC 300  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GACCCAGACAAAGCCCAACAATTGGTTCAAAACCGTGTGTCTCAGGCCATGCCCGTTTA 360  
 ATCC17978 GACCCAGATAAAGCCCAACAATTGGTTCAAAACCGTGTGTCTCAGGCCATGCCCGTTTA 360  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CCTGAAGATGTACAGCGCTTAGGTGTAACCACACTAAAAAGCTCACCTACTTTAACTATG 420  
 ATCC17978 CCTGAAGATGTACAGCGCTTAGGTGTAACCACACTAAAAAGCTCACCTACTCTAACTATG 420  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GTAGTGCATCTGACCTCACCAGATAATCGCTATGACATGACCTACTTACGTAACATATGCG 480  
 ATCC17978 GTAGTGCATCTGACCTCACCAGATAATCGCTATGACATGACCTACTTACGTAACATATGCG 480  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GTGCTCAACGTA AAAAGACCGTTTGGCACGTTTACAAGGTGTAGGTGAAGTCGGTTTATTT 540  
 ATCC17978 GTGCTCAACGTA AAAAGACCGTTTAGCGCGTTTACAAGGGTTAGGTGAAGTCGGATTATTT 540  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GGATCTGGTGACTACGCGATGCGCGTATGGCTTGACCCGCAAAAAGTAGCCAGCGTAAC 600  
 ATCC17978 GGATCTGGTGACTACGCGATGCGCGTATGGCTTGACCCGCAAAAAGTAGCCAGCGTAAC 600  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 AE38 CTCACCGCGACCGAAATTGTGAATGCAATCCGTGAACAAAACATTAGGTTGCAGCAGGT 660  
 ATCC17978 CTTCACAGCCACTGAAATTGTGAATGCAATCCGTGAACAAAACATTAGGTTGCAGCGGGT 660  
 \*\* \* \* \* \* \*  
 AE38 ACAATCGGTGCATCACCAAGTAATTCACCTTTGCAACTTTCAGTGAATGCTCAAGGTCGT 720  
 ATCC17978 ACAATCGGTGCATCACCAAGTAATTCACCTTTACAGCTTTCGGTCAATGCTCAAGGTCGT 720  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TTAACCACTGAGCAAGAATTTGCCGATATCATTTAAAAACTGCCCTGATGGCGCGGT 780  
 ATCC17978 TTAACCACTGAGCAAGAATTTGCCGATATCATTTAAAAACTGCTCCGACGGTGCAGTC 780  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ACCCGATTGGGTGATGTTGCACGTGTTGAACTCGCAGCCTCTCAATACGGCTTACGTTCA 840  
 ATCC17978 ACCCGATTGGGTGATGTTGCACGTGTTGAACTCGCAGCTTCAATATGGCTTACGTTCA 840  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TTA CTTGATAATAAACAAGCGGTGCGGATTCCAATTTTCCAAGCAACAGGTGCGAATGCT 900  
 ATCC17978 TTGCTTGATAATAAACAAGCTGTGCGCAATTTCCAATTTTCCAAGCTCCGGGTGCGAATGCT 900  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 AE38 TTACAAGTTTCCGATCAAGTGCGTAGCACAATGAAGGAGCTTTCAAAAGATTTTCCATCT 960  
 ATCC17978 TTACAAGTTTCCGATCAAGTGCGTAGCACAATGAAGGAGCTTTCAAAAGATTTTCCATCT 960  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TCAATTAATACGACATTGTTTATGACCCGACTCAATTCGTACGGGCCAGTATTAAGCG 1020  
 ATCC17978 TCAATTAATACGACATTGTTTATGACCCGACTCAGTTCGTACGGGCCAGTATTAAGCG 1020  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GTCGTTACATACCTTACTTGAAGCAATTGCACTGGTTGTTGTGGTTGTTATTTTATTTTTA 1080  
 ATCC17978 GTCGTTACATACCTTACTTGAAGCAATTGCACTGGTTGTTGTGGTTGTTATTTTATTCTTA 1080  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 CAAACATGGCGTGCCTCAATCATTCATTGCTTGCCGTACCAAGTTTCAATTATTGGTACA 1140  
 ATCC17978 CAAACATGGCGCGCCTCAATCATTCATTGCTTGCCGTACCAAGTTTCAATTATTGGTACA 1140  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TTCGCACTCATGCTCGCTTTTGGTTACTCAATCAATGCGCTATCACTGTTCCGGATGGTA 1200  
 ATCC17978 TTCGCGCTCATGCTCGCTTTTGGTTACTCAATCAATGCGCTATCACTGTTCCGGATGGTG 1200  
 \*\*\*\*\*

AE38 CTTGCCATCGGTTATTGTCGTCGATGACGCGATTGTGGTCGTCGAAAATGTCGAGAGGAAT 1260  
ATCC17978 CTTGCCATCGGCATTGTCGTCGATGACGCGATTGTGGTCGTCGAAAATGTCGAGAGGAAT 1260  
\*\*\*\*\*

AE38 ATTGAAGCAGGCTTAAACCCAAGGGAGGCGACTTACCGTGCCATGCGAGAAGTCAGTGGA 1320  
ATCC17978 ATTGAAGCAGGCTTAAACCCAAGGGAGGCGACTTACCGTGCCATGCGAGAAGTCAGTGGA 1320  
\*\*\*\*\*

AE38 CCGATTATTGCCATTGCTTTAACACTTGTTCAGTATTCGTACCTCTTGCCTTTATGACA 1380  
ATCC17978 CCGATTATTGCCATTGCTTTAACACTTGTTCAGTATTCGTACCTCTTGCCTTTATGACA 1380  
\*\*\*\*\*

AE38 GGCTTAACAGGGCAATTCTATAAAACAATTTGCCATGACTATTGCCATTTCAACGGTTATT 1440  
ATCC17978 GGCTTAACAGGGCAATTCTATAAAACAATTTGCCATGACCATTGCCATTTCAACGGTTATT 1440  
\*\*\*\*\*

AE38 TCGGCATTTAACTCGCTTACCCTATCTCCATGCTTTGGCAGCGCTGTTACTGAAAGGACAT 1500  
ATCC17978 TCGGCATTTAACTCACTCACCTATCTCCAGCTTTGGCAGCGCTGTTACTTAAAGGACAC 1500  
\*\*\*\*\*

AE38 GATGCTAAACCGGATGCCTTAACACGTATTATGAATCGTTATTCGGTCGTTTCTTTGCA 1560  
ATCC17978 GATGCTAAACCTGATGCCTTAACACGTATTATGAATCGTCATTCGGTCGTTTCTTTGCA 1560  
\*\*\*\*\*

AE38 CTGTTTAACCGTGTGTTTTACGTGCTTCAGATCGTTATAGTCAAGGTGTCAGCCGTGTC 1620  
ATCC17978 CTGTTTAACCGTGTGTTTTACGTGCTTCAGACCCTTATAGTCAAGCGTCAGCCGTGTC 1620  
\*\*\*\*\*

AE38 ATTTCCCATAAAGCTTCGGCAATGGGTGCTATGCAGCACTTCTAGGTTTAAACCGTTGGT 1680  
ATCC17978 ATTTCCCATAAAGCTTCGGCAATGGGTGCTATGCAGCACTTCTAGGTTTAAACCGTTGGT 1680  
\*\*\*\*\*

AE38 ATTTCCCTATATTGTTCCAGGTGGTTTCGTTCCCTGCGCAGGACAAAACAATATTTAATTAGC 1740  
ATCC17978 ATTTCCCTATATTGTTCCAGGGCGTTTCGTTCCCTGCGCAGGACAAAACAATATTTAATTAGC 1740  
\*\*\*\*\*

AE38 TTTGCGCAGCTACCAAACGGCGCTCATTAGATCGTACCGAAGCGGTCATTCGTAAAATG 1800  
ATCC17978 TTTGCGCAGCTACCAAACGGCGCATCATTAGATCGTACCGAAGCATGTCATTCGTAAAATG 1800  
\*\*\*\*\*

AE38 AGTGACACTGCCCTTAAACAACCTGGTGTAGAAAAGTGCGGTTGCCTTTCCTGGCCTATCA 1860  
ATCC17978 AGTGACACTGCACTTAAACAGCCTGGTGTAGAAAAGTGCTGTTGCCTTCCCTGGCCTCTCA 1860  
\*\*\*\*\*

AE38 ATTAACGGTTTCACCAATAGCTCGAGTGCCTGGTATTGTCTTTGTGACTTTAAAGCCATT 1920  
ATCC17978 ATTAATGGTTTCACCAATAGCTCTAGCGCTGGTATTGTCTTTGTGACTTTAAAGCCATT 1920  
\*\*\*\*\*

AE38 GATGAACGTAAGGCTTAAAGACTTATCTGCAAATGCTATTGCAGGTGCACTCAACCAGAAA 1980  
ATCC17978 GATGAACGTAAGGCAAAAAGACTTATCTGCAAATGCAATTGCAGGTGCGCTCAACCAGAAA 1980  
\*\*\*\*\*

AE38 TATTCAGCTATTCAAGATGCTTATATCGCTGTTTTCCACCACCACCAGTGATGGGCTTA 2040  
ATCC17978 TATTCAGCTATTCAAGATGCTTATATCGCGTTTTCCACCACCACCAGTGATGGGCTTA 2040  
\*\*\*\*\*

AE38 GGCACGATGGGCGGCTTTAAACTGCAACTGAAGACCGAGGTGCCTTAGGCTATTAGCC 2100  
ATCC17978 GGTACTATGGGCGGCTTTAAACTGCAACTGAAGACCGAGGTGCCTTAGGCTATTAGCC 2100  
\*\*\*\*\*

AE38 TTGAACGATGCTGCTCAAACTTTATGAAAGCAGCACAAATCAGCCCCTGAACTGGTCCA 2160

ATCC17978 TTGAACGATGCTGCTCAAAACTTTATGAAGGCAGCACAATCAGCCCCTGAACTTGGTCCA 2160  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ATGTTCTCAAGTTATCAAATTAACGTACCTCAACTCAACCGTAGATCTGGACCGTGTAAAA 2220  
 ATCC17978 ATGTTCTCAAGTTATCAAATTAACGTGCCTCAACTCAATGTAGATCTGGACCGTGTAAAA 2220  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GCTAAACAGCAAGGCGTTGCTGTTACAGATGTTTTCAACACTATGCAGATTTATTTAGGT 2280  
 ATCC17978 GCTAAACAGCAAGGCGTTGCTGTGACAGATGTTTTCAACACTATGCAGATTTATTTAGGT 2280  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TCTCAGTACGTTAACGACTTTAACCGCTTTGGACGTGTTTATCAGGTTCGTGCACAAGCC 2340  
 ATCC17978 TCTCAGTACGTTAACGACTTTAACCGTTTTGGACGTGTTTATCAGGTCCGTGCACAAGCC 2340  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GATGCGCCTTCCGTGCTAACCCCTGAAGATATTTTGCAGCTTAAAACCCGTAATAGTGCC 2400  
 ATCC17978 GATGCGCCTTCCGTGCTAACCCCTGAAGATATTTTGCAGCTTAAAACCCGTAATAGTGCC 2400  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GGACAAATGGTGCCATTATCTTCATTGGTGAATGTAACCTCAAACCTATGGTCTGAAATG 2460  
 ATCC17978 GGACAAATGGTGCCATTATCTTCATTGGTGAATGTAACCTCAAACCTATGGTCTGAAATG 2460  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GTCGTTTCGTTATAACGTTACACATCAGCAGATATTAACGGCGGCCCTGCCCCAGGTTAT 2520  
 ATCC17978 GTCGTTTCGTTATAACGTTACACATCAGCAGATATTAACGGCGGCCCTGCCCCAGGTTAT 2520  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TCATCTAGCCAAGCAGAAGCTGCGGTTGAACGTATTGCTGCACAAACTCTACCGCGTGGT 2580  
 ATCC17978 TCATCTAGCCAAGCAGAAGCTGCGGTTGAACGTATTGCTGCACAAACTCTACCGCGTGGT 2580  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 ATCAAGTTTGAATGGACAGATTTAACTTACCAAAAAATCTTGGCTGGTAATGCTGGACTT 2640  
 ATCC17978 ATCAAGTTTGAATGGACAGATTTAACTTACCAAAAAATCTTGGCTGGTAATGCTGGACTT 2640  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TGGGTATTCCCTATTAGCGTATTACTCGTGTCTTAGTATTAGCTGCTCAGTATGAAAGC 2700  
 ATCC17978 TGGGTATTCCCTATTAGCGTATTACTCGTGTCTTAGTATTAGCTGCTCAGTATGAAAGC 2700  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TTAACCCTACCATTAGCAGTTATCTTAATTGTACCAATGGGAATCTTAGCGGCTCTGACA 2760  
 ATCC17978 TTAACCCTACCATTAGCAGTTATCTTAATTGTACCAATGGGAATCTTAGCGGCTCTGACA 2760  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GGTGTCTGGTTGACAGCTGGAGATAACAACATCTTTACTTCAAATCGGTCTAAATGGTACTG 2820  
 ATCC17978 GGTGTCTGGTTGACAGCTGGAGATAACAACATCTTTACTCCAAATCGGTCTAAATGGTACTG 2820  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GTCGGGCTAGCCTGTAAAAATGCATCTTAATTGTTGAATTTGCGCGGGAACTTGAAATG 2880  
 ATCC17978 GTGGGGCTAGCCTGTAAAAATGCTATTTTGATTGTCGAATTTGCGCGGGAACTTGAAATG 2880  
 \*\* \*\*\*\*\*  
 AE38 CAAGGTGCGACTGCCTTTAAAGCAGCTGTTGAAGCAAGTCGTCTACGTTTACGCCCAATT 2940  
 ATCC17978 CAAGGTGCGACTGCCTTTAAAGCAGCCGTTGAAGCAAGTCGTCTACGTTTACGCCCAATT 2940  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 TTAATGACCTCTATTGCATTTATTATGGGTGTAGTGCCACTGGTACTTCAACTGGCGCA 3000  
 ATCC17978 TTAATGACCTCTATTGCATTTATTATGGGTGTAGTGCCACTGGTACTTCAACTGGCGCA 3000  
 \*\*\*\*\*  
 AE38 GGTTCTGAAATGCGACATGCGATGGGTGTTGCCGTATTCTTCGGCATGATCGGTGTAACA 3060  
 ATCC17978 GGTTCTGAAATGCGACATGCGATGGGTGTTGCCGTATTCTTCGGTATGATCGGTGTAACA 3060  
 \*\*\*\*\*

```

AE38          TTCTTTGGTTTATTCTCACCCTGGCCTTTTACGTTCTGATTTCGTACCCTCAACAGCAA 3120
ATCC17978    TTCTTTGGTTTATTCTCACCCTGGCCTTTTACGTTCTGATTTCGTACCCTCAACAGCAA 3120
*****

AE38          CATAAACTGCATTCTGCGGCAGTTCATGAAGCGCGTTAGCTAGCCACACGATCATTAA 3180
ATCC17978    CATAAACTACATCTGCGGCAGTTCATGAAGCGCGTTAGCTAGCCACACGATCATTAA 3180
*****

```

**Anexo 9. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *adeG* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeG* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          MNISKFFIDRPIFAGVLSVLILLAGLLSVFQLPISEYPEVVPPSVVVRAQYPGANPKVIA 60
ATCC17978    MNISKFFIDRPIFAGVLSVLILLAGLLSVFQLPISEYPEVVPPSVVVRAQYPGANPKVIA 60
*****

AE38          ETVASPLEESINGVEDMLYMQSQANS DGNLTI TVNFKLGIDPDKAQQLVQNRVSQAMPRL 120
ATCC17978    ETVASPLEESINGVEDMLYMQSQANS DGNLTI TVNFKLGIDPDKAQQLVQNRVSQAMPRL 120
*****

AE38          PEDVQRLGVTTLKSSPTLTMVVHLTSPDNR YDMTYLRNYAVLNVKDR LARLQGVGEVGLF 180
ATCC17978    PEDVQRLGVTTLKSSPTLTMVVHLTSPDNR YDMTYLRNYAVLNVKDR LARLQGVGEVGLF 180
*****

AE38          GSGDYAMRVWLDPQKVAQRNLTATEIVNAIREQNIQVAAGTIGASPSNSPLQLSVNAQGR 240
ATCC17978    GSGDYAMRVWLDPQKVAQRNLTATEIVNAIREQNIQVAAGTIGASPSNSPLQLSVNAQGR 240
*****

AE38          LTTEQEFADII LKTAPDGA VTRLGDVARVELAASQYGLRSLLDNKQAVAIPIFQAPGANA 300
ATCC17978    LTTEQEFADII LKTAPDGA VTRLGDVARVELAASQYGLRSLLDNKQAVAIPIFQAPGANA 300
*****

AE38          LQVSDQVRSTMKELSKDFPSSIKYDIVDPTQFVRASIKAVVHTLLEAIALV VVVVILFL 360
ATCC17978    LQVSDQVRSTMKELSKDFPSSIKYDIVDPTQFVRASIKAVVHTLLEAIALV VVVVILFL 360
*****

AE38          QTWRASII PLLAVPVSIIIGTFALMLAFGYSINALSLFGMVLAIGIVVDDAIVVVENVERN 420
ATCC17978    QTWRASII PLLAVPVSIIIGTFALMLAFGYSINALSLFGMVLAIGIVVDDAIVVVENVERN 420
*****

AE38          IEAGLNPREATYRAMREVSGPIIAIALTLVAVFVPLAFMTGLTGQFYKQFAMTIAISTVI 480
ATCC17978    IEAGLNPREATYRAMREVSGPIIAIALTLVAVFVPLAFMTGLTGQFYKQFAMTIAISTVI 480
*****

AE38          SAFNSLTLSPALAALLLKGHDAKPDALTRIMNRVIFGRFFALFNRVFSRASDRYSQGVSRV 540
ATCC17978    SAFNSLTLSPALAALLLKGHDAKPDALTRIMNRVIFGRFFALFNRVFSRASDRYSQGVSRV 540
*****

AE38          ISHKASAMGVYAALLGLTVGISYIVPGGFVPAQDKQYLISFAQLPNGASLDRTEAVIRKM 600
ATCC17978    ISHKASAMGVYAALLGLTVGISYIVPGGFVPAQDKQYLISFAQLPNGASLDRTEAVIRKM 600
*****

AE38          SDTALKQPGVESAVAF PGLSINGFTNSSSAGIVFVTLKPFDERKAKDLSANAIAGALNQK 660
ATCC17978    SDTALKQPGVESAVAF PGLSINGFTNSSSAGIVFVTLKPFDERKAKDLSANAIAGALNQK 660
*****

```

AE38	YSAIQDAYIAVFPFPPVMGLGTMGGFKLQLEDRGALGYSALNDAAQNFMKAAQSAPELGP	720
ATCC17978	YSAIQDAYIAVFPFPPVMGLGTMGGFKLQLEDRGALGYSALNDAAQNFMKAAQSAPELGP	720
*****		
AE38	MFSSYQINVPQLNVDLDRVKAKQQGVAVTDVFNMTMQIYLGSIYVNDFNRFGRVYQVRAQA	780
ATCC17978	MFSSYQINVPQLNVDLDRVKAKQQGVAVTDVFNMTMQIYLGSIYVNDFNRFGRVYQVRAQA	780
*****		
AE38	DAPFRANPEDILQLKTRNSAGQMVPLSSLVNVVTQTYGPEMVVRYNGYTSADINGGPAPGY	840
ATCC17978	DAPFRANPEDILQLKTRNSAGQMVPLSSLVNVVTQTYGPEMVVRYNGYTSADINGGPAPGY	840
*****		
AE38	SSSQAEAAVERIAAQTLPRGIKFEWTDLTYQKILAGNAGLWVFPISVLLVFLVLAAQYES	900
ATCC17978	SSSQAEAAVERIAAQTLPRGIKFEWTDLTYQKILAGNAGLWVFPISVLLVFLVLAAQYES	900
*****		
AE38	LTLPLAVILIVPMGILAALTGVWLTAGDNNIFTQIGLMVLVGLACKNAILIVEFARELEM	960
ATCC17978	LTLPLAVILIVPMGILAALTGVWLTAGDNNIFTQIGLMVLVGLACKNAILIVEFARELEM	960
*****		
AE38	QGATAFKAAVEASRLRLRPILMTSIAFIMGVVPLVTSTGAGSEMRHAMGVAVFFGMIGVT	1020
ATCC17978	QGATAFKAAVEASRLRLRPILMTSIAFIMGVVPLVTSTGAGSEMRHAMGVAVFFGMIGVT	1020
*****		
AE38	FFGLFLTPAFYVLIIRTLNSKHKLHSAAVHEAPLSPHDH	1059
ATCC17978	FFGLFLTPAFYVLIIRTLNSKHKLHSAAVHEAPLSPHDH	1059
*****		

## Anexo 10. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *adeN* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeN* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

AE38	ATGCATGATCCAGTCCTTGAGTCACATCATCTCGTATGTGAAAAACCCCAAACACGCCGC	60
ATCC17978	ATGCATGATCCAGTCCTTGAGTCACATCATCTCGTATGTGAAAAACCCCAAACACGCCGC	60
*****		
AE38	GGTATAGAACGTCGTTTAGCTCTATTGCTAAGCGCAACCGAGCTGTTTTGGAAAAAGGA	120
ATCC17978	GGTATAGAACGTCGTTTAGCTCTATTGCTAAGCGCAACCGAGCTGTTTTGGAAAAAGGA	120
*****		
AE38	TATGATGCTGTCTCTCTTGACGACATCGTCAATCATGCTGGTGGTTCAAAAACCTCTATT	180
ATCC17978	TATGATGCTGTCTCTCTTGACGACATCGTCAATCATGCTGGTGGTTCAAAAACCTCTATT	180
*****		
AE38	TATAAATACTTCGGTAATAAAGATGGCTTATTTACTGCAATCTGCGATTATCGCCGTGAA	240
ATCC17978	TATAAATACTTCGGTAATAAAGATGGCTTATTTACTGCAATCTGCGATTATCGCCGTGAA	240
*****		
AE38	ATGTTTTTTAAAGATATCTGCATTGCATTTCAACCAGAGCAAACCTTCTTTAAAAGATTAT	300
ATCC17978	ATGTTTTTTAAAGATATCTGCATTGCATTTCAACCAGAGCAAACCTTCTTTAAAAGATTAT	300
*****		
AE38	TTAATCCAAACTCTCATCCGTTTTTATAAACACATTATTCAACCTGAACACATTGCCTTT	360
ATCC17978	TTAATCCAAACTCTCATCCGTTTTTATAAGCACATTATTCAACCTGAACACATTGCCTTT	360
*****		

```

AE38          TTACGTTTGGTTATTGAACAACTCAATGTAATGCAACTTTGAGCCAATACTTATATGAA 420
ATCC17978    TTACGTTTGGTTATTGAACAACTCAATGTAATGCAACTTTGAGCCAATACTTATATGAA 420
*****

AE38          AAATGTGCTCTGGATGTCCAAAATACAATTGCTCAAGCCTTACTCATATCTCATCAATCA 480
ATCC17978    AAATGTGCTCTGGATGTCCAAAATACAATTGCTCAAGCCTTACTCATATCTCATCAATCA 480
*****

AE38          GGTGAAATTACCTGTACATCTCCTGATCATTCCTCTCTTATGTATTTTGGAAATTTACGT 540
ATCC17978    GGTGAAATTACCTGTACATCTCCTGATCATTCCTCTCTTATGTATTTTGGAAATTTACGT 540
*****

AE38          GATATTGAATGGCGAATGATTATGGGAATGCCTCTTCCACCAATGAGACAGAAGTTATT 600
ATCC17978    GATATTGAATGGCGAATGATTATGGGAATGCCTCTTCCACCAATGAGACAGAAGTTATT 600
*****

AE38          GATTATATTAATACTATTGTGTTGATATTTTCTTCTGTACACGATAAAAATAGATAA 657
ATCC17978    GATTATATTAATACTATTGTGTTGATATTTTCTTAAAGGGGCATCATAAAGTCTAA--- 654
***** * ** ***** *

```

**Anexo 11. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *adeN* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeN* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          MHDPVLESHHLVCEKQPTRRGIERRLALLLSATELFLEKGYDAVSLDDIVNHAGGSKTSI 60
ATCC17978    MHDPVLESHHLVCEKQPTRRGIERRLALLLSATELFLEKGYDAVSLDDIVNHAGGSKTSI 60
*****

AE38          YKYFGNKDGLFTAICDYRREMFFKDICIAFQPEQTSKDYLIQTLIRFYKHIIQPEHIAF 120
ATCC17978    YKYFGNKDGLFTAICDYRREMFFKDICIAFQPEQTSKDYLIQTLIRFYKHIIQPEHIAF 120
*****

AE38          LRLVIEQTQCNATLSQYLYEKCALDVQNTIAQALLISHQSGETTCTSPDHSSLMYFGILR 180
ATCC17978    LRLVIEQTQCNATLSQYLYEKCALDVQNTIAQALLISHQSGETTCTSPDHSSLMYFGILR 180
*****

AE38          DIEWRMIMGMLPPNETEVIDYINYCVDIFFSVHDKNR 218
ATCC17978    DIEWRMIMGMLPPNETEVIDYINYCVDIFLKGHHKV- 217
***** :. *

```

**Anexo 12. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *adeJ* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeJ* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          ATGGCACAAATTTTTATTTCATCGCCCATATTTGCGTGGGTGATTGCATTAGTCATTATG 60
ATCC17978    ATGGCACAAATTTTTATTTCATCGCCCATATTTGCGTGGGTGATTGCATTAGTCATTATG 60
*****

AE38          TTGGCGGGTATTCTTACGCTAACAAAAATGCCTATTGCACAATATCCAACGATTGCACCA 120
ATCC17978    TTGGCGGGTATTCTTACGCTAACAAAAATGCCTATTGCACAATATCCAACGATTGCACCA 120
*****

```

AE38 CCAACCGTAACGATTGCTGCGACTTATCCTGGTGCATCGGCTGAAACAGTTGAAAATACT 180  
ATCC17978 CCAACCGTAACGATTGCTGCGACTTATCCTGGTGCATCGGCTGAAACAGTTGAAAATACT 180  
\*\*\*\*\*

AE38 GTAACCCAGATCATTGAACAACAAATGAATGGTCTTGATGGCTTACGTTATATTTTCATCT 240  
ATCC17978 GTAACCCAGATCATTGAACAACAAATGAATGGTCTTGATGGCTTACGTTATATTTTCATCT 240  
\*\*\*\*\*

AE38 AACAGTGCTGGTAATGGTCAGGCATCTATTCAATTAACCTTTGAACAAGGTGTTGACCCT 300  
ATCC17978 AACAGTGCTGGTAATGGTCAGGCATCTATTCAATTAACCTTTGAACAAGGTGTTGACCCT 300  
\*\*\*\*\*

AE38 GATATTGCACAGGTTCAAGTTCAAAACAAATTGCAATCTGCAACTGCGCTTTTACCTGAA 360  
ATCC17978 GATATTGCACAGGTTCAAGTTCAAAACAAATTGCAATCTGCAACTGCGCTTTTACCTGAA 360  
\*\*\*\*\*

AE38 GATGTACAACGTCAAGGTGTAACAGTTACTAAATCTGGTGCAGCTTCTTGCAAGTTATT 420  
ATCC17978 GATGTACAACGTCAAGGTGTAACAGTTACTAAATCTGGTGCAGCTTCTTGCAAGTTATT 420  
\*\*\*\*\*

AE38 GCATTCTATTACCAGATAACAACCTGTCAGACTCTGACATTAAAGACTACGTAAACTCG 480  
ATCC17978 GCATTCTATTACCAGATAACAACCTGTCAGACTCTGACATTAAAGACTACGTAAACTCG 480  
\*\*\*\*\*

AE38 TCAATTAAGAACCCTTAGCCGTGTTGCCGGTGTGGTGAGGTACAGGTCTTCGGTGGC 540  
ATCC17978 TCAATTAAGAACCCTTAGCCGTGTTGCCGGTGTGGTGAGGTACAGGTCTTCGGTGGC 540  
\*\*\*\*\*

AE38 TCATACGCAATGCGTATCTGGCTTGATCCAGCTAAATTAACAAGCTATCAACTTACTCCT 600  
ATCC17978 TCATACGCAATGCGTATCTGGCTTGATCCAGCTAAATTAACAAGCTATCAACTTACTCCT 600  
\*\*\*\*\*

AE38 AGTGATATTGCAACTGCCTTACAAGCGCAGAACTCGCAAGTTGCGTAGGTGAGTTAGGT 660  
ATCC17978 AGTGATATTGCAACTGCCTTACAAGCGCAGAACTCGCAAGTTGCGTAGGTGAGTTAGGT 660  
\*\*\*\*\*

AE38 GGTGCTCCGGCTGTACAAGGTCAAGTTCTTAAACGCAACAGTAAATGCACAAAGCTTATTG 720  
ATCC17978 GGTGCTCCGGCTGTACAAGGTCAAGTTCTTAAACGCAACAGTAAATGCACAAAGCTTATTG 720  
\*\*\*\*\*

AE38 CAGACTCCTGAACAGTTTAAAAATATCTTCTTAAAGAACACAGCATCAGGTGCTGAGGTT 780  
ATCC17978 CAGACTCCTGAACAGTTTAAAAATATCTTCTTAAAGAACACAGCATCAGGTGCTGAGGTT 780  
\*\*\*\*\*

AE38 CGATTAAGAAGATGTTGCTCGCGTAGAATTAGGTTCGGATAACTATCAATTGACTCGAAG 840  
ATCC17978 CGATTAAGAAGATGTTGCTCGCGTAGAATTAGGTTCGGATAACTATCAATTGACTCGAAG 840  
\*\*\*\*\*

AE38 TTTAACGGTAAACCGGCAGCTGGTCTTGCAATTAATAATGCAACAGGTGCTAACGCACTC 900  
ATCC17978 TTTAACGGTAAACCGGCAGCTGGTCTTGCAATTAATAATGCAACAGGTGCTAACGCACTC 900  
\*\*\*\*\*

AE38 GACACAGCCGAAGCAGTTGAACAACGTTTATCTGAACTACGTAAGAACTATCCAACAGGT 960  
ATCC17978 GACACAGCCGAAGCAGTTGAACAACGTTTATCTGAACTACGTAAGAACTATCCAACAGGT 960  
\*\*\*\*\*

AE38 CTTGCAGATAAACTGGCTTATGACACGACTCCATTTATCCGTCTTTCAATTGAAAGTGTA 1020  
ATCC17978 CTTGCAGATAAACTGGCTTATGACACGACTCCATTTATCCGTCTTTCAATTGAAAGTGTA 1020  
\*\*\*\*\*

AE38 GTACACACATTAATTGAAGCCGTGATTTTGGTATTCATTGTCATGTTCCATTCTTACAA 1080  
ATCC17978 GTACACACATTAATTGAAGCCGTGATTTTGGTATTCATTGTCATGTTCCATTCTTACAA 1080

```

*****
AE38      AACTGGCGTGCAACGATTATTCCAACGCTTGACAGTTCCAGTAGTTGTATTAGGTACATTT 1140
ATCC17978 AACTGGCGTGCAACGATTATTCCAACGCTTGACAGTTCCAGTAGTTGTATTAGGTACATTT 1140
*****

AE38      GCGGTCATTAATATCTTTGGCTTCTCAATTAACACCTTAACCATGTTTCGCTATGGTATTG 1200
ATCC17978 GCGGTCATTAATATCTTTGGCTTCTCAATTAACACCTTAACCATGTTTCGCTATGGTATTG 1200
*****

AE38      GCAATCGGCTTCTGGTCGACGACGCCATTGTTGTAGTCGAAAACGTTGAACGTGTGATG 1260
ATCC17978 GCAATCGGCTTCTGGTCGACGACGCCATTGTTGTAGTCGAAAACGTTGAACGTGTGATG 1260
*****

AE38      AGTGAAGACCATAACCGATCCGGTTACGGCCACTTCTCGCTCAATGCAGCAGATTTCTGGT 1320
ATCC17978 AGTGAAGACCATAACCGATCCGGTTACGGCCACTTCTCGCTCAATGCAGCAGATTTCTGGT 1320
*****

AE38      GCGTTAGTAGGTATTACCAGCGTATTGACAGCGGTATTCGTACCAATGGCTTCTTTGGT 1380
ATCC17978 GCGTTAGTAGGTATTACCAGCGTATTGACAGCGGTATTCGTACCAATGGCTTCTTTGGT 1380
*****

AE38      GGTACAACAGGTGTAATTTACCGCCAGTTCTCGATTACCCTTGTAACGCAATGGTTCTG 1440
ATCC17978 GGTACAACAGGTGTAATTTACCGCCAGTTCTCGATTACCCTTGTAACGCAATGGTTCTG 1440
*****

AE38      TCGTTAATTGTAGCGTTGACGTTACACCCGGCACTTTGTGCAACTATCTTGAAACAGCAT 1500
ATCC17978 TCGTTAATTGTAGCGTTGACGTTACACCCGGCACTTTGTGCAACTATCTTGAAACAGCAT 1500
*****

AE38      GATCCTAATAAAGAACCAAGCAATAATATCTTTGCGCGTTTCTTTAGAAGCTTTAACAAT 1560
ATCC17978 GATCCTAATAAAGAACCAAGCAATAATATCTTTGCGCGTTTCTTTAGAAGCTTTAACAAT 1560
*****

AE38      GGTTTTGACCGCATGTGCGCATAGCTACCAAAATGGTGTAGCCGCATGCTTAAAGGCAAA 1620
ATCC17978 GGTTTTGACCGCATGTGCGCATAGCTACCAAAATGGTGTAGCCGCATGCTTAAAGGCAAA 1620
*****

AE38      ATCTTCTCTGGCGTGCTCTATGCTGTTGTAGTTGCCCTTTTAGTCTTCTTGTTCAAAAA 1680
ATCC17978 ATCTTCTCTGGCGTGCTCTATGCTGTTGTAGTTGCCCTTTTAGTCTTCTTGTTCAAAAA 1680
*****

AE38      CTCCCGTCTTCATTCTTACCAGAAGAAGATCAGGGTGTGGTCATGACACTTGTACAATTA 1740
ATCC17978 CTCCCGTCTTCATTCTTACCAGAAGAAGATCAGGGTGTGGTCATGACACTTGTACAATTA 1740
*****

AE38      CCACCAAATGCAACGCTTGACCGTACCGGTAAAGTGATTGATACCATGACTAACTTCTTT 1800
ATCC17978 CCACCAAATGCAACGCTTGACCGTACCGGTAAAGTGATTGATACCATGACTAACTTCTTT 1800
*****

AE38      ATGAATGAAAAAGATACCGTGAATCTATTTTCACTGTTTCTGGTTTCTCATTACAGGT 1860
ATCC17978 ATGAATGAAAAAGATACCGTGAATCTATTTTCACTGTTTCTGGTTTCTCATTACAGGT 1860
*****

AE38      GTTGGTCAAACCGGGTATTGGCTTCGTTAAGTTGAAAGACTGGAGCAAACGTACGACA 1920
ATCC17978 GTTGGTCAAACCGGGTATTGGCTTCGTTAAGTTGAAAGACTGGAGCAAACGTACGACA 1920
*****

AE38      CCAGAAACTCAAATTGGTTCATTGATTACGCGTGGTATGGCATTAAATATGATCATTTAA 1980
ATCC17978 CCAGAAACTCAAATTGGTTCATTGATTACGCGTGGTATGGCATTAAATATGATCATTTAA 1980
*****

```

AE38 GATGCATCATACTGTTATGCCGTTACAGCTTCCAGCAATGCCTGAACTTGGTGTAACTGCC 2040  
 ATCC17978 GATGCATCATACTGTTATGCCGTTACAGCTTCCAGCAATGCCTGAACTTGGTGTAACTGCC 2040  
 \*\*\*\*\*

AE38 GGATTTAACTTGCAGCTTAAAGATTCAAGTGGTCAAGGCCATGAGAACTGATTCGAGCT 2100  
 ATCC17978 GGATTTAACTTGCAGCTTAAAGATTCAAGTGGTCAAGGCCATGAGAACTGATTCGAGCT 2100  
 \*\*\*\*\*

AE38 CGTAACACGATTTTAGGTTTGGCATCACAAGATAAACGCTCTGTAGGTGTGCGTCCAAAT 2160  
 ATCC17978 CGTAACACGATTTTAGGTTTGGCATCACAAGATAAACGCTCTGTAGGTGTGCGTCCAAAT 2160  
 \*\*\*\*\*

AE38 GGTGAGGAAGATACTCCTCACTATCAAATTAATGTAGATCAGGCTCAAGCTGGTGTATG 2220  
 ATCC17978 GGTGAGGAAGATACTCCTCACTATCAAATTAATGTAGATCAGGCTCAAGCTGGTGTATG 2220  
 \*\*\*\*\*

AE38 GCGGTTAGTATTGCCGAAATCAACAATACAATGCGTATTGCATGGGGTGGCTCATAACATT 2280  
 ATCC17978 GCGGTTAGTATTGCCGAAATCAACAATACAATGCGTATTGCATGGGGTGGCTCATAACATT 2280  
 \*\*\*\*\*

AE38 AACGATTTTCGTTGACCGTGGTTCGTGTGAAAAAGTTTATGTTCAGGTTGATGCGGGCAGC 2340  
 ATCC17978 AACGATTTTCGTTGACCGTGGTTCGTGTGAAAAAGTTTATGTTCAGGTTGATGCGGGCAGC 2340  
 \*\*\*\*\*

AE38 CGTATGATGCCGTAAGACTTAAACAAATGGTATGTACGTAATAACAAAGGTGAGATGGTT 2400  
 ATCC17978 CGTATGATGCCGTAAGACTTAAACAAATGGTATGTACGTAATAACAAAGGTGAGATGGTT 2400  
 \*\*\*\*\*

AE38 CCATTCTCGGCATTTGCTACAGGCGAATGGACGTATGGTTCTCCACGTCTCGAACGTTAT 2460  
 ATCC17978 CCATTCTCGGCATTTGCTACAGGCGAATGGACGTATGGTTCTCCACGTCTCGAACGTTAT 2460  
 \*\*\*\*\*

AE38 AACGGCTGTGCATCGTTAACATTCAAGGTACACCTGCACCTGGCGTGAGCTCTGGTGAT 2520  
 ATCC17978 AACGGCTGTGCATCGTTAACATTCAAGGTACACCTGCACCTGGCGTGAGCTCTGGTGAT 2520  
 \*\*\*\*\*

AE38 GCCATGAAAGCAATGGAAGAAATTTATTGGTAAGTTACCATCTATGGGCTTACAAGGTTTC 2580  
 ATCC17978 GCCATGAAAGCAATGGAAGAAATTTATTGGTAAGTTACCATCTATGGGCTTACAAGGTTTC 2580  
 \*\*\*\*\*

AE38 GACTATGAGTTGGACAGGCTTATCACTTGAAGAACGTGAGTCTGGTGTCAAGCGCCGTTTC 2640  
 ATCC17978 GACTATGAGTTGGACAGGCTTATCACTTGAAGAACGTGAGTCTGGTGTCAAGCGCCGTTTC 2640  
 \*\*\*\*\*

AE38 TTATACGCACTTTCATTGTTAATCGTATTCCCTTGGCTGGCTGCACTATATGAAAGCTGG 2700  
 ATCC17978 TTATACGCACTTTCATTGTTAATCGTATTCCCTTGGCTGGCTGCACTATATGAAAGCTGG 2700  
 \*\*\*\*\*

AE38 TCAATTCCGTTCTCGGTTTTACTTGTGGTACCACTTGGTGTCAATTGGTGCATTCGTATTG 2760  
 ATCC17978 TCAATTCCGTTCTCGGTTTTACTTGTGGTACCACTTGGTGTCAATTGGTGCATTCGTATTG 2760  
 \*\*\*\*\*

AE38 ACCTACTTGGGCATGATTATTAAGGAGATCCAAATCTCTCAAATAACATTTACTTCCAG 2820  
 ATCC17978 ACCTACTTGGGCATGATTATTAAGGAGATCCAAATCTCTCAAATAACATTTACTTCCAG 2820  
 \*\*\*\*\*

AE38 GTAGCGATTATTGCGGTTATCGGTCTTTCTGCAAAAAATGCGATCTTGATTGTTGAATTC 2880  
 ATCC17978 GTAGCGATTATTGCGGTTATCGGTCTTTCTGCAAAAAATGCGATCTTGATTGTTGAATTC 2880  
 \*\*\*\*\*

AE38 GCAAAAAGAAATTCAGGAAAAAGGTGAAGATCTACTTGATGCAACCTTACATGCTGCAAAA 2940  
 ATCC17978 GCAAAAAGAAATTCAGGAAAAAGGTGAAGATCTACTTGATGCAACCTTACATGCTGCAAAA 2940

```

*****
AE38      ATGCGTTTACGTCCAATTATCATGACCACCCCTTGCCCTTCGGTTTCGGTGTACTTCCACTT 3000
ATCC17978 ATGCGTTTACGTCCAATTATCATGACCACCCCTTGCCCTTCGGTTTCGGTGTACTTCCACTT 3000
*****

AE38      GCACTTTCAACAGGTGCCGGTGCAGGAAGTCAGCACTCTGTAGGCTTTGGTGTACTTGGT 3060
ATCC17978 GCACTTTCAACAGGTGCCGGTGCAGGAAGTCAGCACTCTGTAGGCTTTGGTGTACTTGGT 3060
*****

AE38      GCGTACTCAGCGCAGCTTCTTAGGAATCTTCTTTATCCCTGTATTCTATGTGTGGATT 3120
ATCC17978 GCGTACTCAGCGCAGCTTCTTAGGTATCTTCTTTATCCCTGTATTCTATGTGTGGATT 3120
*****

AE38      CGTAGTATCTTTAAGTACAAACCAAAAACCATAAACTCAGGAGCATAAAATCGTGA 3177
ATCC17978 CGTAGTATCTTTAAGTACAAACCAAAAACCATAAACTCAGGAGCATAAAATCGTGA 3177
*****

```

**Anexo 13. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *adeJ* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *adeJ* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38      MAQFFIHRPIFAWVIALVIMLAGILTLTKMPIAQYPTIAPPTVTIAATYPGASAETVENT 60
ATCC17978 MAQFFIHRPIFAWVIALVIMLAGILTLTKMPIAQYPTIAPPTVTIAATYPGASAETVENT 60
*****

AE38      VTQIEEQQMNGLDGLRYISSNSAGNQASIQLNFEQGVDPDIAQVQVQNKLQSATALLPE 120
ATCC17978 VTQIEEQQMNGLDGLRYISSNSAGNQASIQLNFEQGVDPDIAQVQVQNKLQSATALLPE 120
*****

AE38      DVQRQGVTVTKSGASFLQVIAFYSPDNNLSDSDIKDYVNSSIKEPLSRVAGVGEVQVFGG 180
ATCC17978 DVQRQGVTVTKSGASFLQVIAFYSPDNNLSDSDIKDYVNSSIKEPLSRVAGVGEVQVFGG 180
*****

AE38      SYAMRIWLDPAKLTSYQLTPSDIATALQAQNSQVAVGQLGGAPAVQGQVLNATVNAQSLL 240
ATCC17978 SYAMRIWLDPAKLTSYQLTPSDIATALQAQNSQVAVGQLGGAPAVQGQVLNATVNAQSLL 240
*****

AE38      QTPEQFKNIFLKNTASGAEVRLKDVARELGSNDYQFDSKFNKPAAGLAIKIATGANAL 300
ATCC17978 QTPEQFKNIFLKNTASGAEVRLKDVARELGSNDYQFDSKFNKPAAGLAIKIATGANAL 300
*****

AE38      DTAEAVEQRLSELRKNYPTGLADKLAYDTPFIRLSIESVVHTLIEAVILVFIVMFLFLQ 360
ATCC17978 DTAEAVEQRLSELRKNYPTGLADKLAYDTPFIRLSIESVVHTLIEAVILVFIVMFLFLQ 360
*****

AE38      NWRATIIPTLAVPVVVLGTFVINIFGFSINTLTMFAMVLAIGLLVDDAIVVVENVERVM 420
ATCC17978 NWRATIIPTLAVPVVVLGTFVINIFGFSINTLTMFAMVLAIGLLVDDAIVVVENVERVM 420
*****

AE38      SEDHTDPVTATSRSMQQISGALVGITSVLTAVFVPMAFFGGTTGVIYRQFSITLVTAMVL 480
ATCC17978 SEDHTDPVTATSRSMQQISGALVGITSVLTAVFVPMAFFGGTTGVIYRQFSITLVTAMVL 480
*****

AE38      SLIVALTFTPALCATILKQHPNKEPSNNIFARFFRSFNNGFDRMESHYQNGVSRMLKKG 540
ATCC17978 SLIVALTFTPALCATILKQHPNKEPSNNIFARFFRSFNNGFDRMESHYQNGVSRMLKKG 540

```

```

*****
AE38      IFSGVLYAVVVALLVFLFQKLPSSFLPEEDQGVVMTLVQLPPNATLDRTGKVIDTMTNFF 600
ATCC17978 IFSGVLYAVVVALLVFLFQKLPSSFLPEEDQGVVMTLVQLPPNATLDRTGKVIDTMTNFF 600
*****

AE38      MNEKDTVESIFTVSGFSFTGVGQNAGIGFVKLKDWSKRTPETQIGSLIQRGMALNMIK 660
ATCC17978 MNEKDTVESIFTVSGFSFTGVGQNAGIGFVKLKDWSKRTPETQIGSLIQRGMALNMIK 660
*****

AE38      DASVVMPLQLPAMPPELGVTAGFNLQKLDSSGQGHEKLIARNTILGLASQDKRLVGVVRPN 720
ATCC17978 DASVVMPLQLPAMPPELGVTAGFNLQKLDSSGQGHEKLIARNTILGLASQDKRLVGVVRPN 720
*****

AE38      GQEDTPQYQINVDQAQAGAMGVSAEINNTMRIAWGGSYINDFVDRGRVKKVYVQGDAGS 780
ATCC17978 GQEDTPQYQINVDQAQAGAMGVSAEINNTMRIAWGGSYINDFVDRGRVKKVYVQGDAGS 780
*****

AE38      RMPEDLNKWYVRNNGEMVPPSAFATGEWTYGSRLERYNGVSSVNIQGTAPAGVSSGD 840
ATCC17978 RMPEDLNKWYVRNNGEMVPPSAFATGEWTYGSRLERYNGVSSVNIQGTAPAGVSSGD 840
*****

AE38      AMKAMEEIIIGKLPSMGLQGFDEYEWTLGSLEERESGAQAPFLYALSLLIVFLCLAALYESW 900
ATCC17978 AMKAMEKIIIGKLPSMGLQGFDEYEWTLGSLEERESGAQAPFLYALSLLIVFLCLAALYESW 900
*****:*****

AE38      SIPFSVLLVPLGVIGAVLTYLGMIIKGDPNLSNNIYFQVAIIAVIGLSAKNAILIVEF 960
ATCC17978 SIPFSVLLVPLGVIGAVLTYLGMIIKGDPNLSNNIYFQVAIIAVIGLSAKNAILIVEF 960
*****

AE38      AKELQEKGEDLLDATLHAAKMLRPIIMTTLAFGFGVLPLALSTGAGAGSQHSVGFVGLG 1020
ATCC17978 AKELQEKGEDLLDATLHAAKMLRPIIMTTLAFGFGVLPLALSTGAGAGSQHSVGFVGLG 1020
*****

AE38      GVLSATFLGIFIPVFYVWIRSIFKYKPKTINTQEHKS 1058
ATCC17978 GVLSATFLGIFIPVFYVWIRSIFKYKPKTINTQEHKS 1058
*****

```

**Anexo 14. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *abeM* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *abeM* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38      GTGTCGAATGTCACGTCGTTTCGGTCTGAATTAACAACCTCTCCATTTAATGTTACCT 60
ATCC17978 GTGTCGAATGTCACGTCGTTTCGGTCTGAATTAACAACCTCTCCATTTAATGTTACCT 60
*****

AE38      ATTTTAATTACGCAGTTTGTCTCAAGCAGGGTTGGGTTAATTGATACCATTATGGCTGGG 120
ATCC17978 ATTTTAATTACGCAGTTTGTCTCAAGCAGGGTTGGGTTAATTGATACCATTATGGCTGGG 120
*****

AE38      CATTTATCTGCTGCAGACTTAGCCGCGATTGCGGTAGGTGTAGGCTTATGGATTCCAGTC 180
ATCC17978 CATTTATCTGCTGCAGACTTAGCCGCTATTGCGGTAGGTGTAGGCTTATGGATTCCAGTC 180
*****

AE38      ATGCTCTTGTTCACTGGTATCATGATTGCAACCACACCATTAGTGGCTGAAGCAAAGGC 240
ATCC17978 ATGCTCTTGTTCACTGGCATATGATTGCAACCACACCATTAGTGGCTGAAGCAAAGGC 240

```

```

***** ** ***** ** *****
AE38      GCTAGAAATACAGAACAAATTCAGTGATTGTCCGCAATCATTATGGGTTGCAGTAATT 300
ATCC17978 GCTAGAAATACAGAGCAAATTCAGTGATTGTCCGCAATCATTATGGGTTGCAGTAATT 300
***** ** ***** ** *****

AE38      CTAGGGGTATTGGCAATGCTCATTTTGCAGCTTATGCCATTTTCTTACATGTGTTTGGC 360
ATCC17978 CTAGGGGTATTGGCAATGCTCATTTTGCAGCTTATGCCATTTTCTTACATGTGTTTGGC 360
***** ** ***** ** *****

AE38      GTACCAGAAAGTTTACAACCTAAAGCCAGTTTATTCTTACATGCAATTGGTTTGGGTATG 420
ATCC17978 GTACCAGAAAGTTTACAACCTAAAGCCAGTTTATTCTTACATGCAATTGGTTTGGGTATG 420
***** ** ***** ** *****

AE38      CCCGCTGTAACCATGTATGCAGCGCTCCGAGGCTATTCCGAAGCATTAGGCCATCCCGC 480
ATCC17978 CCCGCTGTAACCATGTATGCAGCGCTCCGAGGCTATTCCGAAGCATTAGGCCATCCCGC 480
***** ** ***** ** *****

AE38      CCTGTCACGGTCATTAGCTTACTAGCCTTAGTGGTTTTAATCCCGCTTAACATGATTTTT 540
ATCC17978 CCTGTCACGGTCATTAGCTTACTAGCCTTAGTGGTTTTAATCCCGCTTAACATGATTTTT 540
***** ** ***** ** *****

AE38      ATGTATGGCTTAGGACCAATACCTGCTTTGGGTAGCGCAGGCTGTGGTTTTGCAACATC 600
ATCC17978 ATGTATGGCTTAGGACCAATACCTGCTTTGGGTAGCGCAGGCTGTGGTTTTGCAACATC 600
***** ** ***** ** *****

AE38      ATTTTACAGTGGCTGATGCTCATTACGTTAGCAGGCTATATTTATAAGGCTTCGGCTTAT 660
ATCC17978 ATTTTACAGTGGCTGATGCTCATTACGTTAGCAGGCTATATTTATAAGGCTTCGGCTTAT 660
***** ** ***** ** *****

AE38      CGAAACACATCTATTTTTAGCAGATTTCGATAAAAATTAACCTGACTTGGGTAAAAGAATT 720
ATCC17978 CGAAACACATCTATTTTTAGCAGATTTCGATAAAAATTAATCTGACTTGGGTAAAAGAATT 720
***** ** ***** ** *****

AE38      TTACAGCTTGGCTGCCAATTGGTTTAGCTGTGTTTTTTGAAGTGAGTATTTTTAGTACA 780
ATCC17978 TTACAGCTCGGCTGCCAATTGGTTTAGCTGTGTTTTTTGAAGTGAGTATTTTTAGTACA 780
***** ** ***** ** *****

AE38      GGGGCATTGGTCCTTAGCCCTCTAGGAGAAGTCTTTATTGCCGCACACCAAGTAGCGATT 840
ATCC17978 GGGGCATTGGTCCTTAGCCCTCTAGGGAAGTCTTTATTGCCGCACACCAAGTAGCGATT 840
***** ** ***** ** *****

AE38      TCAGTCACTTCGGTATTATTATGATTCCACTTCTCTTGCCATTGCTTTAACTATTTCGC 900
ATCC17978 TCAGTCACTTCGGTACTGTTTATGATTCCACTTCTCTTGCCATTGCTTTAACCATTTCGC 900
***** ** ***** ** *****

AE38      GTGGGGACGTATATGGTGAAAAGAAGTGGGCTTCCATGTACAAGTACAAAAAATTGGT 960
ATCC17978 GTGGGGACGTATATGGCGAAAAGAAGTGGGCTTCCATGTACAAGTACAAAAAATTGGT 960
***** ** ***** ** *****

AE38      CTAAGCACAGCAGTATTTTTGCTCTATTGACCATGTCTTTTATTGCTCTAGCCGTGAA 1020
ATCC17978 CTAAGCACAGCAGTATTTTTGCTCTATTGACCATGTCTTTTATTGCTTTAGCCGTGAA 1020
***** ** ***** ** *****

AE38      CAAATTGTCTCGGTTTATACTCAAGATATAAATGTTGTGCCGGTTGCCATGTATTTGCTC 1080
ATCC17978 CAAATTGTCTCGGTTTATACTCAAGATATAAATGTTGTGCCGGTTGCCATGTATTTGCTC 1080
***** ** ***** ** *****

AE38      TGGTTTGCAATGGCATATCAATTAATGGATGCCCTACAAGTTAGCGCTGCCGGCTGTTTA 1140
ATCC17978 TGGTTTGCAATGGCATATCAATTAATGGATGCTCTACAAGTCAGCGCTGCCGGCTGTTTA 1140
***** ** ***** ** *****

```

```

AE38      AGAGGTATGCAAGATACTCAGGCACCGATGTGGATCACCTTTAATGGCATATTGGGTAATT 1200
ATCC17978 AGAGGTATGCAAGATACTCAGGCACCGATGTGGATCACCTTTAATGGCGTATTGGGTAATT 1200
          *****

AE38      GCTTTTCCAATCGGTCTTTATTTAGCGCGTTATAACCGATTGGGGCGTAGCTGGTGTGTGG 1260
ATCC17978 GCTTTTCCAATCGGTCTTTATTTAGCGCGTTATAACCGATTGGGGCGTAGCTGGTGTGTGG 1260
          *****

AE38      TTAGGTTTAATTATTGGTTTAAAGTATTGCCTGTGTTTTATTGCTCTCACGACTCTATTTG 1320
ATCC17978 TTAGGTTTAATTATTGGTTTAAAGTATTGCCTGTGTTTTATTGCTCTCACGACTCTATTTG 1320
          *****

AE38      AATACCAAACGTTTAAAGTCAAACCTAA 1347
ATCC17978 AATACCAAACGTTTAAAGTCAAACCTAA 1347
          *****

```

**Anexo 15. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *abeM* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *abeM* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38      MSNVT SFRSELKQLFHLMLPILITQFAQAGFLIDTIMAGHLSAADLAAIAVGVGLWIPV 60
ATCC17978 MSNVT SFRSELKQLFHLMLPILITQFAQAGFLIDTIMAGHLSAADLAAIAVGVGLWIPV 60
          *****

AE38      MLLFSGIMIATPLVAEAKGARNT EQIPVIVRQSLWVAVILGVLAMLILQLMPFFLHVFG 120
ATCC17978 MLLFSGIMIATPLVAEAKGARNT EQIPVIVRQSLWVAVILGVLAMLILQLMPFFLHVFG 120
          *****

AE38      VPESLQPKASLFLHAIIGLMPAVTMYAALRGYSEALGHPRPVTVISLLALVVLIPLNMI 180
ATCC17978 VPESLQPKASLFLHAIIGLMPAVTMYAALRGYSEALGHPRPVTVISLLALVVLIPLNMI 180
          *****

AE38      MYGLGPIPALGSAGCGFATSILQWLMLITLAGYIYKASAYRNTSIFSRFDKINLTWVKRI 240
ATCC17978 MYGLGPIPALGSAGCGFATSILQWLMLITLAGYIYKASAYRNTSIFSRFDKINLTWVKRI 240
          *****

AE38      LQLGLPIGLAVFFEVSIFSTGALVLSPLGEVFIAAHQVAISVTSVLFMIPLSLAIALTIR 300
ATCC17978 LQLGLPIGLAVFFEVSIFSTGALVLSPLGEVFIAAHQVAISVTSVLFMIPLSLAIALTIR 300
          *****

AE38      VGTYYGEKNWASMYQVQKIGLSTAVFFALLTMSFIALGREQIVSVYTQDINVPVAMYLL 360
ATCC17978 VGTYYGEKNWASMYQVQKIGLSTAVFFALLTMSFIALGREQIVSVYTQDINVPVAMYLL 360
          *****

AE38      WFMAYQLMDALQVSAAGCLRGMQDTQAPMWITLMAYWVIAFFPIGLYLARYTDWGVAGVW 420
ATCC17978 WFMAYQLMDALQVSAAGCLRGMQDTQAPMWITLMAYWVIAFFPIGLYLARYTDWGVAGVW 420
          *****

AE38      LGLIIGLSIACVLLLSRLYLNTKRLSQT 448
ATCC17978 LGLIIGLSIACVLLLSRLYLNTKRLSQT 448
          *****

```

**Anexo 16. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *emrB* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *emrB* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38          ATGAAAACGCAAACACCTTTTGCCGAGTTAAGCGGTGGCCGTTTACTACTGGCAGCGTTT 60
ATCC17978    ATGAAAACGCAAACACCTTTTGCCGAGTTAAGCGGTGGCCGTTTACTACTGGCAGCGTTT 60
*****

AE38          GTTATTGCCTTGTGCGAACTTTATGGTCGTACTTGATAACGACCATTGCCAACGTCTCTGTA 120
ATCC17978    GTTATTGCCTTGTGCGAACTTTATGGTCGTACTTGATAACGACCATTGCCAACGTCTCTGTA 120
*****

AE38          CCGCATATTACCGGTAACCTTGTGTTTTCAAGCACACAAGGCACATGGGTCGTTACTTCA 180
ATCC17978    CCGCATATTACCGGTAACCTTGTGTTTTCAAGCACACAAGGCACATGGGTCGTTACTTCA 180
*****

AE38          TATGCAGTTGCAGAAGCGATTGTGTACCTTTAACAGGTTGGCTGGCAGGCCGCTTTGGA 240
ATCC17978    TATGCAGTTGCAGAAGCGATTGTGTACCTTTAACGGTGGCTGGCAGGCCGCTTTGGT 240
*****

AE38          ACGGTGCGGGTCTTTATCTTTGGTTAATTGGCTTTACGGTCTTTTCTTTCCATGCGGT 300
ATCC17978    ACGGTGCGGGTCTTTATCTTTGGTTAATTGGCTTTACGGTCTTTTCTTTCCATGCGGT 300
*****

AE38          TTGGCAACATCGTTAGAAATGTTGGTGTTTTTCCGTATTGGGCAGGGCTTTGTGGTGGT 360
ATCC17978    TTGGCAACATCGTTAGAAATGTTGGTATTTTTCCGTATTGGGCAGGGCTTTGTGGTGGT 360
*****

AE38          CCACTTATGCCACTTAGCCAAACCTTGCTTATGCGTATTTCCCTCAAGAAAAGCATGCG 420
ATCC17978    CCACTTATGCCACTCAGCCAAACCTTGCTTATGCGTATTTCCCTCAAGAAAAGCATGCG 420
*****

AE38          CAGGCAATGGGCCTATGGGCAATGACCACAGTCGTTGGACCAATTTAGGACCAATTTTG 480
ATCC17978    CAGGCAATGGGCCTATGGGCAATGACCACAGTCGTCGGGCCAATTTAGGACCAATTTTG 480
*****

AE38          GGTGGTCTGATTAGTGATAACCTGTCTTGGCACTGGATCTTCTTTATTAACCTACCAGTT 540
ATCC17978    GGTGGTCTGATTAGTGATAACCTGTCTTGGCACTGGATCTTCTTTATTAACCTACCAGTT 540
*****

AE38          GGTATTGTCTGTGATTAGCAGCAATGCGCTTGTTAAGAGTAGCTGAAACAGAAACCATT 600
ATCC17978    GGTATTGTCTGTGATTAGCAGCAATGCGCTTGTTAAGAGTAGCTGAAACAGAAACCATT 600
*****

AE38          TCTTTAAGAATCGACACTGTTGGTTTAGGTCTATTAATTCTGTGGATTGGTGCATTACAG 660
ATCC17978    TCTTTAAGAATCGACACTGTTGGTTTAGGTCTATTAATTCTGTGGATTGGTGCATTACAG 660
*****

AE38          CTTATGCTCGACTTGGGGCATGAACGCGACTGGTTTAAACAGCACCAGCATTGTGGTTTTTA 720
ATCC17978    CTTATGCTCGACTTGGGGCATGAACGCGACTGGTTTAAATAGCACCAGTATTGTGATTTTA 720
*****

AE38          GCTTTAACTGCCGCCATTGGCTTTGTGGTGTTCCTGATATGGGAACCTCACCGATAAGCAC 780
ATCC17978    GCTTTAACTGCCGCCATTGGCTTTGTGGTGTTCCTGATATGGGAGCTCACCGACAACAC 780
*****

AE38          CCCGTGGTGGATGTCAAAGTCTTTAGGCATAGGGGCTTTGCCATTTCGGTACTGGCCTTG 840
ATCC17978    CCCGTGGTAGATGTCAAAGTCTTTAGGCATAGGGGCTTTGCCATTTCGGTACTGGCCTTG 840

```

```

*****
AE38      TCGCTCGGCTTTGGTGCATTCTTTGGCAGTATTGTACTGATACCGCAGTGGCTGCAAATG 900
ATCC17978 TCGCTCGGCTTTGGCGCATTCTTTGGCAGTATTGTACTGATACCGCAGTGGCTGCAAATG 900
*****

AE38      AACCTTTCCTATACCGCGACGTGGGCCGGATATTTAACTGCAACCATGGGCTTTGGTAGT 960
ATCC17978 AACCTTTCCTATACCGCGACGTGGGCCGGATATTTAACTGCAACCATGGGCTTTGGTAGT 960
*****

AE38      TTGACCATGTCACCGATTGTGGCAAACCTTTCGACCAAACATGACCCGCGTGCCTGGCG 1020
ATCC17978 TTGACCATGTCACCGATTGTGGCAAACCTTTCGACCAAACATGACCCGCGTGCCTGGCG 1020
*****

AE38      AGCTTTGGTTTAATTTTGCTGGGTATTGTGACCTTAATGCGGGCATTCTGGACCACAGAT 1080
ATCC17978 AGCTTTGGTTTAATTTTGCTGGGTATTGTGACCTTAATGCGGGCATTCTGGACCACAGAT 1080
*****

AE38      GCCGACTTTATGGCACTGGCTTGGCCGCAAATCCTGCAAGGTTTGCAGTACCGTTCTTC 1140
ATCC17978 GCCGACTTTATGGCACTGGCTTGGCCGCAAATCCTGCAAGGTTTGCAGTACCGTTCTTC 1140
*****

AE38      TTTATCCACTGTCTAACATTGCACTGGGTTTCGGTGTTCAGCAAGAAATTGCATCTGCT 1200
ATCC17978 TTTATCCACTGTCTAACATTGCACTGGGTTTCGGTGTTCAGCAAGAAATTGCATCTGCT 1200
*****

AE38      GCGGGCCTCATGAACTTCTTAAGAACCATGGCAGGGGCGATTGGCGCTTCAATTGCGGTG 1260
ATCC17978 GCGGGCCTCATGAACTTCTTAAGAACCATGGCAGGGGCGATTGGCGCTTCAATTGCGAGTG 1260
*****

AE38      ACCGTGTGGGACGACCACGCCAAAGTTGCCCGTAGTGAAATGGTGTCAAACCTACATACC 1320
ATCC17978 ACCGTGTGGGACGACCACGCCAAAGTTGCCCGTAGTGAAATGGTGTCAAACCTACATACC 1320
*****

AE38      ACTGAAGTACAAAACACACTTTTGCAAATGGTTTTACGGCTGACTCGACTTTAGGCATT 1380
ATCC17978 ACTGAAGTACAAAACACACTTTTGCAAATGGTTTTACGGCTGACTCGACTTGGCAATT 1380
*****

AE38      ATTTCAAACCTTGTGATAAAGAAGCCATTACCATGTCGGCAAACCATGTGTTTTTACTG 1440
ATCC17978 ATTTCAAACCTTGTGATAAAGAAGCCATTACCATGTCGGCAAACCATGTGTTTTTACTG 1440
*****

AE38      TTTGCGATCGTGTGTTGTCTTTGCGGGGCTGGTCAATTGGCTGTGTCCAAAACCAAACAG 1500
ATCC17978 TTTGCGATCGTGTGTTGTCTTTGCAAGGGCTGGTCAATTGGCTGTGTCCAAAACCAAACAG 1500
*****

AE38      GTTAGCGGTATGCCTTCTCACTAA 1524
ATCC17978 GTTAGCGGTATGCCTTCTCACTAA 1524
*****

```

**Anexo 17. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *emrB* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *emrB* de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AE38      MKTQTPFAELSGRLLLAFFVIALSNFMVVLDTTIANVSVPHITGNLAVSSTQGTWVVT 60

```

```

ATCC17978      MKTQTPFAELSGRLLLAAFVIALSNFMVVLDTTIANVSVPHITGNLAVSSTQGTWVVT 60
                *****

AE38           YAVAEAICVPLTGWLAGRFGTVRVFIFGLIGFTVFSFLCGLATSLEMLVFFRIGQGLCGG 120
ATCC17978     YAVAEAICVPLTGWLAGRFGTVRVFIFGLIGFTVFSFLCGLATSLEMLVFFRIGQGLCGG 120
                *****

AE38           PLMPLSQTLMLRIFPQEKHAQAMGLWAMTTVVGPILGPIGLGLISDNLSWHWIFFINLPV 180
ATCC17978     PLMPLSQTLMLRIFPQEKHAQAMGLWAMTTVVGPILGPIGLGLISDNLSWHWIFFINLPV 180
                *****

AE38           GIVCVLAAMRLLRVAETETISLRIDTVGLGLLILWIGALQLMLDLGHERDWFNSTSIVVL 240
ATCC17978     GIVCVLAAMRLLRVAETETISLRIDTVGLGLLILWIGALQLMLDLGHERDWFNSTSIVVL 240
                *****:

AE38           ALTAAGFVFLIWEITDKHPVVDVKVFRHRGFAISVLALS LGFGAFFGSIVLIPQWLQM 300
ATCC17978     ALTAAGFVFLIWEITDKHPVVDVKVFRHRGFAISVLALS LGFGAFFGSIVLIPQWLQM 300
                *****

AE38           NLSYTATWAGYLTATMGFGSLTMSPIVAKLSTKHDPRALASFGILLGIVTLMRAFWTDD 360
ATCC17978     NLSYTATWAGYLTATMGFGSLTMSPIVAKLSTKHDPRALASFGILLGIVTLMRAFWTDD 360
                *****

AE38           ADFMALAWPQILQGFVAPFFFIPLSNIALGSLVQOEIASAAGLMNFLRMTMAGAIGASIAV 420
ATCC17978     ADFMALAWPQILQGFVAPFFFIPLSNIALGSLVQOEIASAAGLMNFLRMTMAGAIGASIAV 420
                *****

AE38           TVWDDHAKVARSEMVSNLHTTEVQNTLLQNGFTADSTLGIISNLVDKEAITMSANHVFL 480
ATCC17978     TVWDDHAKVARSEMVSNLHTTEVQNTLLQNGFTADSTLGIISNLVDKEAITMSANHVFL 480
                *****

AE38           FAIVFVFAGLVIWLCPKPKQVSGMP SH 507
ATCC17978     FAIVFVFAGLVIWLCPKPKQVSGMP SH 507
                *****

```

**Anexo 18. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *gyrA* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *gyrA* de las cepas *A. baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* ACICU y *A. baumannii* AYE.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AYE           MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMHELGN DYNKA 60
AE38          MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMHELGN DYNKA 60
ACICU         MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMHELGN DYNKA 60
ATCC17978     MSVSEIRPIAIEDELKHSYLDYAMSIVSRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMHELGN DYNKA 60
                *****

AYE           YKKSARVVG DVIGKYHPHGD LAVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQGNFGS IDGDSAAAMRY 120
AE38          YKKSARVVG DVIGKYHPHGD LAVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQGNFGS IDGDSAAAMRY 120
ACICU         YKKSARVVG DVIGKYHPHGD LAVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQGNFGS IDGDSAAAMRY 120
ATCC17978     YKKSARVVG DVIGKYHPHGD LAVYETIVRMAQDFSLRYLLVDGQGNFGS IDGDSAAAMRY 120
                *****

AYE           TEVRMTKLAHELLADLEKDTVDWEDNYDGSERIPEVLPTRV PNL LINGAAGIAVGMATNM 180
AE38          TEVRMTKLAHELLADLEKDTVDWEDNYDGSERIPEVLPTRV PNL LINGAAGIAVGMATNM 180
ACICU         TEVRMTKLAHELLADLEKDTVDWEDNYDGSERIPEVLPTRV PNL LINGAAGIAVGMATNM 180
ATCC17978     TEVRMTKLAHELLADLEKDTVDWEDNYDGSERIPEVLPTRV PNL LINGAAGIAVGMATNM 180

```

```

*****
AYE          APHNMTEVVNACLAYADNPNISIEGLMEYITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI 240
AE38        APHNMTEVVNACLAYADNPNISIEGLMEYITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI 240
ACICU       APHNMTEVVNACLAYADNPNISIEGLMEYITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI 240
ATCC17978   APHNMTEVVNACLAYADNPNISIEGLMEYITGPDFPTGGIIYGKSGIVDAYRTGKGRHLHI 240
*****

AYE          RGKYHFEDEKTRTTIVFTEIPYQVNKARVIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR 300
AE38        RGKYHFEDEKTRTTIVFTEIPYQVNKARVIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR 300
ACICU       RGKYHFEDEKTRTTIVFTEIPYQVNKARVIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR 300
ATCC17978   RGKYHFEDEKTRTTIVFTEIPYQVNKARVIERIAELVKEKKLEGISELRDES DKEGMR 300
*****

AYE          IAIDLKRGENAEEVVNNLFLNTQLENSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV 360
AE38        IAIDLKRGENAEEVVNNLFLNTQLENSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV 360
ACICU       IAIDLKRGENAEEVVNNLFLNTQLENSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV 360
ATCC17978   IAIDLKRGENAEEVVNNLFLNTQLENSFSINMVCLDNGQP KLMNLKDI IAAFIRHRQEVV 360
*****

AYE          TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLLAGEWAGGGVVA 420
AE38        TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLLAGEWAGGGVVA 420
ACICU       TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLLAGEWAGGGVVA 420
ATCC17978   TRRTMFELRKARERGHILEGLTVALANIDEI IETIKTSANPAEARERLLAGEWAGGGVVA 420
*****

AYE          LLEKAGAISVRPDEIEGEDPNRPFGLSDSFYRLSPTQVGAI LELRLHRLTGLEQDKLHAE 480
AE38        LLEKAGAISVRPDEIEGEDPNRPFGLSDSFYRLSPTQVGAI LELRLHRLTGLEQDKLHAE 480
ACICU       LLEKAGAISVRPDEIEGEDPNRPFGLSDSFYRLSPTQVGAI LELRLHRLTGLEQDKLHAE 480
ATCC17978   LLEKAGAISVRPDEIEGEDPNRPFGLSDSFYRLSPTQVGAI LELRLHRLTGLEQDKLHAE 480
*****

AYE          YTEILGQIAELTAILNDFNLLMGVIREELAQVLQOYGDARTE IVE SRVDFCREDLIPEE 540
AE38        YTEILGQIAELTAILNDFNLLMGVIREELAQVLQOYGDARTE IVE SRVDFCREDLIPEE 540
ACICU       YTEILGQIAELTAILNDFNLLMGVIREELAQVLQOYGDARTE IVE SRVDFCREDLIPEE 540
ATCC17978   YTEILGQIAELTAILNDFNLLMGVIREELAQVLQOYGDARTE IVE SRVDFCREDLIPEE 540
*****

AYE          QVVLTVSQTYAKTQPLSDYQAQRGGRGKSATSMKDDDFIQHLIVASNHATVLCFTNVG 600
AE38        QVVLTVSQTYAKTQPLSDYQAQRGGRGKSATSMKDDDFIQHLIVASNHATVLCFTNVG 600
ACICU       QVVLTVSQTYAKTQPLSDYQAQRGGRGKSATSMKDDDFIQHLIVASNHATVLCFTNVG 600
ATCC17978   QVVLTVSQTYAKTQPLSDYQAQRGGRGKSATSMKDDDFIQHLIVASNHATVLCFTNVG 600
*****

AYE          KVYRLKVFEVPQASRGAKGRPIVNLPLDQVTEVTVTAILPLTEFPENHYVFMATASGTVKR 660
AE38        KVYRLKVFEVPQASRGAKGRPIVNLPLDQVTEVTVTAILPLTEFPENHYVFMATASGTVKR 660
ACICU       KVYRLKVFEVPQASRGAKGRPIVNLPLDQVTEVTVTAILPLTEFPENHYVFMATASGTVKR 660
ATCC17978   KVYRLKVFEVPQASRGAKGRPIVNLPLDQVTEVTVTAILPLTEFPENHYVFMATASGTVKR 660
*****

AYE          VELEQFANIRSNGLRAIELNEEDTLIGVAITDGNQQIMLFSNEGKAIRFAETDVRAMGRT 720
AE38        VELEQFANIRSNGLRAIELNEEDTLIGVAITDGNQQIMLFSNEGKAIRFAETDVRAMGRT 720
ACICU       VELEQFANIRSNGLRAIELNEEDTLIGVAITDGNQQIMLFSNEGKAIRFAETDVRAMGRT 720
ATCC17978   VELEQFANIRSNGLRAIELNEEDTLIGVAITDGNQQIMLFSNEGKAIRFAETDVRAMGRT 720
*****

AYE          AKGVRGMRVFSASSTLSEEDADVENDSDDDNDDSDSSLSRIVSLVVVPETGEVLCASA 780
AE38        AKGVRGMRVFSASSTLSEEDADVENDSDDDNDDSDSSLSRIVSLVVVPETGEVLCASA 780
ACICU       AKGVRGMRVFSASSTLSEEDADVENDSDDDNDDSDSSLSRIVSLVVVPETGEVLCASA 780
ATCC17978   AKGVRGMRVFSASSTLSEEDADVENDSDDDNDDSDSSLSRIVSLVVVPETGEVLCASA 780
*****

```

```

AYE          NGYGKRTPVNDFPTKKRGGKGVIAIKTSENGELVGAVSIDETKELLISDGGTLVRTRA 840
AE38         NGYGKRTPVNDFPTKKRGGKGVIAIKTSENGELVGAVSIDETKELLISDGGTLVRTRA 840
ACICU        NGYGKRTPVNDFPTKKRGGKGVIAIKTSENGELVGAVSIDETKELLISDGGTLVRTRA 840
ATCC17978    NGYGKRTPVNDFPTKKRGGKGVIAIKTSENGELVGAVSIDETKELLISDGGTLVRTRA 840
*****

AYE          AEVAMTGRNAQGVRLIRLSEETLVGVVSI EAVEDEEELLEGEVDTTETDSEEAVSNNE 900
AE38         AEVAMTGRNAQGVRLIRLSEETLVGVVSI EAVEDEEELLEGEVDTTETDSEEAVSNNE 900
ACICU        AEVAMTGRNAQGVRLIRLSEETLVGVVSI EAVEDEEELLEGEVDTTETDSEEAVSNNE 900
ATCC17978    AEVAMTGRNAQGVRLIRLSEETLVGVVSI EAVEDEEELLEGEVDTTETDSEEAVSNNE 900
*****

AYE          TSEE          904
AE38         TSEE          904
ACICU        TSEE          904
ATCC17978    TSEE          904
*****

```

**Anexo 19. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen *parC* de la cepa AE38 con la secuencia del gen *parC* de las cepas *A. baumannii* ATCC 17978, *A. baumannii* ACICU y *A. baumannii* AYE.**

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

ACICU        MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS 60
ATCC17978    MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS 60
AE38         MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS 60
AYE          MTSLAHHATENRSVAEFTEQAYLNYAMYVIMDRALPHISDGLKPVQRRIVYAMSELGLKS 60
*****

ACICU        SGKPKKSARTVGDVLGKYHPHGD SACYEAMVLMAPFSYRYPLIEGQGNWGPSDDPKSFA 120
ATCC17978    SGKPKKSARTVGDVLGKYHPHGD SACYEAMVLMAPFSYRYPLIEGQGNWGPSDDPKSFA 120
AE38         SGKPKKSARTVGDVLGKYHPHGD LACYEAMVLMAPFSYRYPLIEGQGNWGPSDDPKSFA 120
AYE          SGKPKKSARTVGDVLGKYHPHGD LACYEAMVLMAPFSYRYPLIEGQGNWGPSDDPKSFA 120
*****

ACICU        AMRYTEAKLSAYSELLLSELGQGTSEWQDNFDGSLKEPITL PARVPNILLNGTTGIAVGM 180
ATCC17978    AMRYTEAKLSAYSELLLSELGQGTSEWQDNFDGSLKEPITL PARVPNILLNGTTGIAVGM 180
AE38         AMRYTEAKLSAYSELLLSELGQGTSEWQDNFDGSLKEPITL PARVPNILLNGTTGIAVGM 180
AYE          AMRYTEAKLSAYSELLLSELGQGTSEWQDNFDGSLKEPITL PARVPNILLNGTTGIAVGM 180
*****

ACICU        ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPQTSDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLLKIQT TGR 240
ATCC17978    ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPQTSDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLLKIQT TGR 240
AE38         ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPQTSDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLLKIQT TGR 240
AYE          ATDIPPHNLREVVKGTIALIRNPQTSDEKLAEYIPAPDLPTKAEIITPPEELLLKIQT TGR 240
*****

ACICU        GSYRMRAVYTIEKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQM QAKKLPLVVDVRDES DHENPTR 300
ATCC17978    GSYRMRAVYTIEKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQM QAKKLPLVVDVRDES DHENPTR 300
AE38         GSYRMRAVYTIEKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQM QAKKLPLVVDVRDES DHENPTR 300
AYE          GSYRMRAVYTIEKNEIVITELPYQVSGSKVITQIADQM QAKKLPLVVDVRDES DHENPTR 300
*****

ACICU        LVIVLRSNRIDAEAVMSHLFATTDLESSYRVNLNMI GEDGRPQVKSIRRILLEWIEIRKK 360
ATCC17978    LVIVLRSNRIDAEAVMSHLFATTDLESSYRVNLNMI GEDGRPQVKSIRRILLEWIEIRKK 360
AE38         LVIVLRSNRIDAEAVMSHLFATTDLESSYRVNLNMI GEDGRPQVKSIRRILLEWIEIRKK 360
AYE          LVIVLRSNRIDAEAVMSHLFATTDLESSYRVNLNMI GEDGRPQVKSIRRILLEWIEIRKK 360

```

```

*****
ACICU          TVTRRLQYHLNRIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA 420
ATCC17978     TVTRRLQYHLNRIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA 420
AE38          TVTRRLQYHLNRIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA 420
AYE           TVTRRLQYHLNRIEKRLHILAGLLIAYLDIDTVIRI IREEDQPKPVLMEHFNIDEIQAEA 420
*****

ACICU          ILELKLRLHLAKLEEMEIRHEQDELSAKAAI IREQLENPESLKNLI IIGELKEDAKKFGDER 480
ATCC17978     ILELKLRLHLAKLEEMEIRHEQDELSAKAAI IREQLENPESLKNLI IIGELKEDAKKFGDER 480
AE38          ILELKLRLHLAKLEEMEIRHEQDELSAKAAI IREQLENPESLKNLI IIGELKEDAKKFGDER 480
AYE           ILELKLRLHLAKLEEMEIRHEQDELSAKAAI IREQLENPESLKNLI ISELKEDAKKFGDER 480
*****

ACICU          RSPIVARAEAVQIKEQDLMPAETVTVVVLSEAGWVRAAKGADVDAENLNRYRAGDQYLSHAV 540
ATCC17978     RSPIVARAEAVQIKEQDLMPAETVTVVVLSEAGWVRAAKGADVDAENLNRYRAGDQYLSHAV 540
AE38          RSPIVARAEAVQIKEQDLMPAETVTVVVLSEAGWVRAAKGADVDAENLNRYRAGDQYLSHAV 540
AYE           RSPIVARAEAVQIKEQDLMPAETVTVVVLSEAGWVRAAKGADVDAENLNRYRAGDQYLSHAV 540
*****

ACICU          GKTNRVYFLDETGRSYALPISNLP SARGLDPLSSKLS PASGVSFIQVYLD DDESELIA 600
ATCC17978     GKTNRVYFLDETGRSYALPISNLP SARGLDPLSSKLS PASGVSFIQVYLD DDESELIA 600
AE38          GKTNRVYFLDETGRSYALPISNLP SARGLDPLSSKLS PASGVSFIQVYLD DDESELIA 600
AYE           GKTNRVYFLDETGRSYALPISNLP SARGLDPLSSKLS PASGVSFIQVYLD DDESELIA 600
*****

ACICU          ASSAGYGFKTQTKQLDTNAKAGKTF LTVPDKAKALPLISAQNMTHLAVLSSAGRLLILD L 660
ATCC17978     ASSAGYGFKTQTKQLDTNAKAGKTF LTVPDKAKALPLISAQNMTHLAVLSSAGRLLILD L 660
AE38          ASSAGYGFKTQTKQLDTNAKAGKTF LTVPDKAKALPLISAQNMTHLAVLSSAGRLLILD L 660
AYE           ASSAGYGFKTQTKQLDTNAKAGKTF LTVPDKAKALPLISAQNMTHLAVLSSAGRLLILD L 660
*****

ACICU          VELPNLNKKGKGNKLIQLEGKEQILSMT TTNLDEIIQVVAGQQHLKLGDDLQKYMGRAS 720
ATCC17978     VELPNLNKKGKGNKLIQLEGKEQILSMT TTNLDEIIQVVAGQQHLKLGDDLQKYMGRAS 720
AE38          VELPNLNKKGKGNKLIQLEGKEQILSMT TTNLDEIIQVVAGQQHLKLGDDLQKYMGRAS 720
AYE           VELPNLNKKGKGNKLIQLEGKEQILSMT TTNLDEIIQVVAGQQHLKLGDDLQKYMGRAS 720
*****

ACICU          KGQLLPRGYQKANKLLIQR          739
ATCC17978     KGQLLPRGYQKANKLLIQR          739
AE38          KGQLLPRGYQKANKLLIQR          739
AYE           KGQLLPRGYQKANKLLIQR          739
*****

```

**Anexo 20. Tabla comparativa de cambios y/o mutaciones en sistemas reguladores y subunidades de bombas de expulsión reportados en *A. baumannii* y en la cepa AE38.**

Cambios/delecciones reportados		Cambios/delecciones en cepa AE38	
<b>AdeL</b>	Thr319Lys, Val139Gly, Gln263Arg, Gln262Arg. Delección de 11 residuos aminoacídicos en el C-terminal.	<b>AdeL</b>	Ninguno
<b>AdeG</b>	No hay reportes.	<b>AdeG</b>	Val514Leu
<b>AdeN</b>	Delección parcial o total por codón de paro prematuro.	<b>AdeN</b>	Val217Asn, His215Asp, Gly213Val, Lys212Ser y Leu211Phe
<b>AdeJ</b>	No hay reportes.	<b>AdeJ</b>	Lys847Glu
<b>AdeR</b>	Asp20Asn, Ala91Val, Pro116Leu, Val120Ile, Asn134Leu, Ala136Val, His158Leu, His195Gln, Glu219Ala, Pro241Leu, Val243Ile.	<b>AdeR</b>	Delección total
<b>AdeS</b>	Gly30Asp, Ala94Val, Gly103Asp, Arg152Lys, Thr153Met, Leu172Pro, Gly186Val, Asn268His, Ser280Ala, Gln281Asp, Tyr303Phe, Ser345Pro.	<b>AdeS</b>	Delección total
<b>AdeB</b>	No hay reportes.	<b>AdeB</b>	Gly306Val, Asn427Ser, Ala552Thr, Ala643Asp, Thr646Ser y Leu731Phe