



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“ESTUDIO PARCIAL DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE
CARBAPENEMASA EN CEPAS DE *Acinetobacter
baumanni*”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

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

PRESENTA:

BIOL. JAIME ALBERTO JIMÉNEZ VILLALPANDO

ASESORA DE TESIS:

D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

PUEBLA, PUE., MÉXICO.

DICIEMBRE 2022



BUAP

Puebla, Pue. a 28 de noviembre 2022.

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 **Jaime Alberto Jiménez Villalpando**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


"Estudio parcial de plásmidos portadores de carbapenemasas en cepas de *Acinetobacter baumannii*"


A nuestro juicio, el alumno **Jaime Alberto Jiménez Villalpando** 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. Rosalva Carmen Rocha Gracia


D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández


D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña


D.C. María Elena Bello López

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

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

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por otorgar la beca de maestría con el número de becario 992382.

Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación y estudios de Posgrado** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 1. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el **Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025**.

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).

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.

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain** por el esfuerzo que ha puesto en mí, por enseñarme que se deben hacer las cosas de la manera correcta. Le agradezco por haberme apoyado y motivado para poder sacar adelante este proyecto y mi maestría, por la paciencia, comprensión y dedicación que ha mostrado conmigo a lo largo de mis estudios. Espero haber llenado sus expectativas y haber dejado mi aporte tanto en el LMHyC como en general respecto a la investigación de este bicho.

A la **D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por hacer un gran equipo con la Doctora Paty y hacer que los estudiantes del LMHyC se encuentren un ambiente agradable y a la vez de disciplina. ¡Gracias por sus enseñanzas, consejos y la experiencia de compartir el laboratorio!

A la **D. C. Margarita María de la Paz Arenas**, gracias por haberme orientado a lo largo de mi formación, para entender que se pueden hacer mejor las cosas y saber que siempre va a haber algo de lo que tenemos que investigar más. Gracias por ayudarme a formarme como investigador.

A la **D. C. Claudia Martínez de la Peña**, le agradezco mucho por sus observaciones y consejos para mejorar mi investigación y le agradezco por todo lo que me ha enseñado de bioinformática, con la esperanza de poder transmitir algún día lo aprendido con usted.

A la **M. en C Jessica Gómez Martínez**, gracias por haberme enseñado a realizar análisis bioinformáticos a detalle, por orientarme y explicarme lo que tenía que hacer en el laboratorio, por la paciencia para explicarme las cosas. Gran parte de esta tesis se realizó gracias a lo que he aprendido contigo. ¡Muchas gracias por todo!

A la **D. C. María Elena Bello López** por apoyarme sin siquiera habernos conocido, por el tiempo para revisar mi tesis, por enseñarme cosas útiles y hacerme saber que este mundo de la microbiología es muy grande pero bonito.

AGADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres: **Jaime** e **Imelda**, por todo el esfuerzo, sacrificio y cariño que han puesto en mí durante toda mi vida, por ayudarme a no rendirme y buscar siempre el modo de apoyarme en mis decisiones. Los quiero mucho y no sé qué hubiera sido de mí sin ustedes.

A mis hermanas: **Amaranta** y **Samantha**, por apoyarme cada una a su modo, por enseñarme muchas cosas y haber compartido con ustedes tantas experiencias agradables.

A mis amigos: **Pepe, Jeras, Vale, Yuli, Carito, Raúl, Carlos y Krishna** porque sé que voy a contar con ustedes sin importar cuán lejos nos encontremos o cuanto tiempo tengamos sin conversar. Gracias por su valiosa amistad.

A mis compañeros de maestría: **Ángel, Kaleb, Óscar y Monse** por el apoyo mutuo que nos brindamos a lo largo del posgrado, el cual realizamos durante una época muy complicada para toda la humanidad. Gracias por hacerme saber que hay personas con las que puedes contar y me siento agradecido por las buenas experiencias vividas durante el poco tiempo pudimos estar juntos en persona.

A mis amigas del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad: **Jessy, María, Yessi y Monse**, por haber hecho de mi estancia en el laboratorio una experiencia muy agradable y divertida, por orientarme en todas mis dudas y también gracias por los pocos momentos en los que pudimos convivir fuera del laboratorio.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Importancia de la resistencia y su diseminación	1
1.2	Características del género <i>Acinetobacter</i>	1
1.3	Importancia clínica	2
1.4	Tratamiento de infecciones causadas por <i>Acinetobacter</i>	3
1.5	Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	5
1.5.1	Modificación del sitio diana.....	5
1.5.2	Bombas de expulsión	5
1.5.3	Cambios en la permeabilidad de la membrana celular	6
1.5.4	Inactivación o modificación del antibiótico	6
1.6	Elementos genéticos móviles/movilizables	8
2	ANTECEDENTES.....	9
3	JUSTIFICACIÓN.....	13
4	OBJETIVO GENERAL.....	14
4.1	OBJETIVOS PARTICULARES EXPERIMENTALES	14
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES BIOINFORMATICOS	14
5	ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL.....	15
6	ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO BIOINFORMÁTICO	15
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7.1	Trabajo experimental.....	16
7.1.1	Cepas de estudio.....	16
7.1.2	Declaración ética	17

7.1.3	Cepas control.....	17
7.1.4	Extracción de ADN por el método de lisis por calor.....	17
7.1.5	Cuantificación de ADN.....	17
7.1.6	Amplificación de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
7.1.7	Electroforesis en gel de agarosa	21
7.1.8	Secuenciación de los productos de PCR.....	21
7.1.9	Análisis de las secuencias de productos de PCR.....	21
7.1.10	Perfil plasmídico mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	21
7.1.11	Determinación de participación de bombas de expulsión en la resistencia a imipenem y ciprofloxacino.....	23
7.2	Trabajo bioinformático.....	24
7.2.1	Base de datos de plásmidos.....	24
7.2.2	Análisis bioinformático de plásmidos	24
8	RESULTADOS	25
8.1	Trabajo experimental.....	25
8.1.1	Determinación de variantes de carbapenemasas.....	25
8.1.2	Perfil plasmídico de cepas de <i>A. baumannii</i>	27
8.1.3	Determinación de bombas.....	29
8.2	Trabajo bioinformático.....	31
8.2.1	Análisis bioinformático de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{OXA-23}	31
8.2.2	Análisis bioinformático de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{NDM}	41
8.2.3	Análisis bioinformático de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{OXA-72}	49
8.2.4	Análisis bioinformático de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{IMP}	54

8.2.5	Clasificación de los plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla</i> _{OXA23} , <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-72} , y <i>bla</i> _{IMP-4} mediante sus replicasas y relaxasas.....	60
9	DISCUSIÓN.....	63
10	CONCLUSIONES.....	72
11	PERSPECTIVAS.....	73
12	BIBLIOGRAFÍA.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. componentes de mezcla para la reacción de PCR para la amplificación de genes de resistencia con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific)	18
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la detección de carbapenemasas en cepas de <i>A. baumannii</i>	20
Tabla 3 Características plasmídicas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
Tabla 4. Participación de bombas de expulsión en la resistencia a imipenen y ciprofloxacino en cepas de <i>A. baumannii</i>	30
Tabla 5. Información de los plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla</i> _{OXA-23} obtenidos de la base de datos Genbank.	31
Tabla 6. Características del <i>backbone</i> de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{OXA-23} de <i>A. baumannii</i> obtenidos de Genbank.	33
Tabla 7. Información de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{NDM-1} de <i>A. baumannii</i> obtenidos de Genbank.	41
Tabla 8. Características del <i>backbone</i> de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{NDM} de <i>A. baumannii</i> obtenidos de Genbank.	44
Tabla 9. Información de los plásmidos portadores de <i>bla</i> _{OXA-72} de <i>A. baumannii</i> obtenidos de Genbank	49
Tabla 10. Características del <i>backbone</i> de plásmidos portadores de <i>bla</i> _{OXA-72} en <i>A. baumannii</i> obtenidos de Genbank.	50
Tabla 11. Información del plásmido portador de <i>bla</i> _{IMP} de <i>A. baumannii</i> obtenidos de Genbank.	54
Tabla 12. Módulos del plásmido de <i>A. baumannii</i> portador de <i>bla</i> _{IMP-4}	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de las cepas reportadas por Verdugo-Yocupicio	16
Figura 2. Corrimiento en agarosa al 1% de los productos de PCR de los genes <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{OXA-23}</i> y <i>bla_{NDM}</i> presentes en <i>A. baumannii</i>	26
Figura 3 Visualización plasmídica por el método PFGE-S1 de 13 cepas de <i>A. baumannii</i> MDR aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla México.....	28
Figura 4 Visualización plasmídica por el método PFGE-S1 de 10 cepas de <i>A. baumannii</i> MDR aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla México.....	28
FIGURA 5. Transposones acarreando <i>bla_{OXA-23}</i> encontrados en este estudio mediante anotaciones de RAST y alineamientos con BLAST.....	35
Figura 6A. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla_{OXA-23}</i>	37
Figura 6B. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla_{OXA-23}</i>	38
Figura 6C. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla_{OXA-23}</i>	39
Figura 6D. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla_{OXA-23}</i>	40
Figura 7. Transposón <i>Tn125</i> encontrado en todos los plásmidos portadores de <i>bla_{NDM-1}</i>	43
Figura 8A. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla_{NDM-1}</i>	47
Figura 8B. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla_{NDM-1}</i>	48

Figura 9A. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla</i> _{OXA-72}	52
Figura 9B. Alineamientos múltiples de plásmidos de <i>A. baumannii</i> portadores de <i>bla</i> _{OXA-72}	53
Figura 10. Integrón clase 1 acarreando <i>bla</i> _{IMP-4}	55
Figura 11. Plásmido de <i>Acinetobacter baumannii</i> portador de <i>bla</i> _{IMP-4}	59
Figura 12. Dendograma de plásmidos de <i>A. baumannii</i> mediante la replicasa repB.	61

ABREVIATURAS

Acb	Complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i>
pb	Pares de bases
BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido
CCCP	Carbonil Cianuro 3-Clorofenilhidrazona
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
T4SS	Sistema de Secreción Tipo IV
T4CP	Proteína Acopladora Tipo IV
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
IPM	Imipenem
MEM	Meropenem
ml	Mililitro
BAL	Lavado bronquioalveolar
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (<i>Multilocus sequence typing</i>)
mM	Milimolar
PAβN	L-Fenilalanina-Arginina-betaNaftilamida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados (<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>)
r.p.m	Revoluciones por minuto
ST	Secuencia tipo
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
mg	Miligramo
μL	Microlitro

Resumen

Introducción: *Acinetobacter baumannii* es un microorganismo que se asocia a infecciones hospitalarias y de la comunidad, ha tomado relevancia en los últimos años debido a su creciente resistencia a antibióticos, incluyendo carbapenémicos. La resistencia a los antibióticos puede ser adquirida gracias a la transferencia horizontal de genes, en la cual los plásmidos juegan un papel importante diseminando estos genes entre bacterias, lo cual ha dificultado los tratamientos.

Objetivos: Determinar y caracterizar parcialmente plásmidos que acarrean carbapenemasa en *Acinetobacter baumannii*.

Materiales y métodos: Se descargaron del Genbank 35 plásmidos cerrados circularizados portadores de *bla*_{IMP} (1), *bla*_{NDM} (10), *bla*_{OXA-72} (6), y *bla*_{OXA-23} (18), de cepas clínicas y dos cepas provenientes de hospitales poblanos secuencias por illumina. Se realizó un análisis *in silico* de los plásmidos (PlacnetW, SPAdes, RAST, BLAST, RESfinder, easyfig, y MEGA 11). En el laboratorio se trabajaron 24 cepas de *A. baumannii* de pacientes del hospital Regional ISSSTE Puebla previamente estudiadas. Se determinó el perfil plasmídico y el peso molecular (PFGE-S1). Se determinó la participación de bombas de expulsión en presencia y ausencia del inhibidor Carbonil Cianuro 3-Clorofenilhidrazona para los antibióticos imipenem y ciprofloxacino. Se realizó la amplificación de carbapenemasas (PCR y secuenciación).

Resultados: El análisis *in silico* de los plásmidos, mostró que la mayoría de plásmidos que comparten la misma carbapenemasa tenían *backbones* similares. Los plásmidos portadores de *bla*_{OXA-23} con un tamaño de entre 70 y 100 kb (n=14), mostraron un *backbone* similar con un sistema de secreción tipo IV. Estos plásmidos a excepción de uno se clasificaron de acuerdo con su replicasa en GR6 y en GR25. De acuerdo con la relaxasa, 2 plásmidos con un tamaño menor a 10 kb pertenecieron a MOB_Q y 9 plásmidos de 70 a 100 kb a MOB_F. Los plásmidos portadores de *bla*_{NDM} tuvieron un tamaño de 39 a 264 kb (n=10). 5 plásmidos de tamaño 39 a 64 kb presentaron la maquinaria completa para conjugación, entre ellos cuatro plásmidos pertenecían a MOB_Q y uno MOB_P. Dos plásmidos de 150 kb se clasificaron en GR3. En el caso de cinco plásmidos con *bla*_{OXA-72} fueron clasificados en el grupo GR29, tuvieron un *backbone* similar, y pertenecían a MOB_Q, otros dos plásmidos con *bla*_{OXA-72} se clasificaron en GR26 y uno más en GR2. De los plásmidos con *bla*_{OXA-23} (n=18), 13 se clasificaron en el grupo GR6 y uno en GR25, a los 4 plásmidos restantes no se les detectó replicasa. Ocho pertenecían a la familia MOB_F, los plásmidos restantes no se pudieron clasificar mediante estas técnicas.

De 24 cepas de *A. baumannii*, dos de las cepas portaban *bla*_{OXA-239} y una cepa portaba *bla*_{IMP-5}. A 4 cepas se les determinó el perfil y peso molecular plasmídicos (3 plásmidos de 191 kb y uno de 205 kb). Por otro lado, en 2 cepas se observó una

participación de bombas de expulsión para imipenem al disminuir la CMI (de 512 a 128 y de 512 a 32), y en 1 cepa se observó la participación de bombas para ciprofloxacino al disminuir la CMI (de 4 a 1).

Conclusiones: Los plásmidos portando *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-72} presentaron *backbones* similares entre ellos, pudiendo ser catalogados como plásmidos conjugativos los portadores de *bla*_{OXA-23}, y como movilizables los plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72}. Los plásmidos con *bla*_{NDM} tuvieron un *backbone* diferente, probablemente debido a la alta diseminación en diferentes géneros bacterianos. En las cepas de *A. baumannii* procedentes de Puebla las cuales fueron analizadas experimentalmente, se observó que fueron portadoras de *bla*_{NDM}. En las cepas con *bla*_{OXA-72} y *bla*_{OXA-239} se observaron plásmidos de tamaño 191 y 205 kb.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, plásmidos, carbapenemasas, bombas de expulsión.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la resistencia y su diseminación

La resistencia de los microorganismos hacia agentes antimicrobianos es un problema importante de salud pública. Algunos organismos patógenos como bacterias, virus, hongos o parásitos que previamente eran tratados con ciertos agentes antimicrobianos han adquirido resistencia a través de diversos mecanismos, entre estos se destaca la resistencia presentada por bacterias a carbapenémicos y polimixinas (Gontijo *et al.*, 2021). El mal uso de los antibióticos ha desencadenado la evolución y diseminación de las bacterias resistentes a los antibióticos, los cuales solían ser empleados de manera rutinaria. Por otro lado, la composición y estructura de dichas bacterias que al hallarse en interacción con otros microorganismos han incrementado esta resistencia a través de mutaciones o la transferencia horizontal de genes mediante elementos genéticos móviles y movilizables, los cuales pueden ser transferidos entre cepas de la misma especie o incluso entre bacterias de diferentes familias (Bottery *et al.*, 2021).

1.2 Características del género *Acinetobacter*

El género *Acinetobacter* comprende bacterias con morfología cocobacilar, Gram negativas, no fermentadoras de glucosa, catalasa positivas, oxidasa negativas. Su genoma tiene un contenido G+C del 39% (Lee *et al.*, 2017), y consta de aproximadamente 3.61 Mpb (Bello-López *et al.*, 2019). Son portadores de plásmidos, los cuales varían en amplios rangos de tamaños que van desde 1,109 hasta 216,780 pb, y algunos de ellos están involucrados en la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Salgado-Camargo *et al.*, 2020).

Acinetobacter puede sobrevivir por mucho tiempo en superficies abióticas, y es resistente a la desecación, se le considera como un patógeno oportunista que afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos y representa un riesgo ya que puede adquirir resistencia a diversos fármacos (Li *et al.*, 2019).

Acinetobacter inicialmente fue llamado *Micrococcus calco-aceticus*, aislado por primera vez en 1911 por un microbiólogo holandés. Pasados 43 años Brisou y Prevot propusieron el género *Acinetobacter*, que proviene del griego “akinetos” cuyo

significado es “no móvil” para así diferenciarlos del género móvil *Achromobacter* (Brisou y Prevot 1954).

En la clasificación taxonómica el género *Acinetobacter*: pertenece al dominio Bacteria, filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Moraxellaceae (Wong *et al.*, 2017). De acuerdo con Alexandr Nemeč, el género *Acinetobacter* consiste en 72 especies, de las cuales 63 especies tienen nombres válidos (<https://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>, la última actualización se realizó en julio del 2021).

Algunas especies destacan por su capacidad de causar infecciones en humanos, como son los integrantes del complejo *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* (Acb), entre los cuales están las especies: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii*, *A. dijkshoorniae* y *A. pittii* (Akrami y Namvar, 2019; Vrancianu *et al.*, 2020; Mancilla *et al.*, 2020), las cuales pueden diferenciarse entre sí mediante análisis genotípicos, ya que fenotípicamente son idénticas (Vanegas *et al.*, 2014).

Existen también otras especies de importancia médica que no pertenecen a este complejo como *A. haemolyticus*, *A. Iwoffii*, *A. johnsonii*, *A. radioresistens*, y *A. junii* (Atrouni *et al.*, 2016)

1.3 Importancia clínica

De acuerdo con la OMS, *A. baumannii* es uno de los organismos más peligrosos que forman parte del grupo de bacterias ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*) que se caracterizan por evadir fácilmente los efectos terapéuticos de los antimicrobianos (Lee *et al.*, 2017). Por otra parte, existen diversos casos de especies de *Acinetobacter* no-*baumannii* que han adquirido multirresistencia como *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis*, las cuales han sido reportadas como causantes de infecciones en centros de salud alrededor del mundo (Atrouni *et al.*, 2016).

Acinetobacter baumannii es una bacteria que se comporta como patógeno oportunista y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y los ambientes

hospitalarios, cuenta con la capacidad de colonizar la piel humana, el tracto respiratorio, la cavidad oral y el tracto gastrointestinal. Además, es uno de los principales patógenos relacionados a infecciones nosocomiales causando meningitis, neumonía, bacteremia, infecciones en la piel y tejidos blandos, e infecciones del tracto urinario (Zhang *et al.*, 2022). En 2017 la Organización Mundial de la Salud catalogó a *A. baumannii* como un patógeno crítico de prioridad número uno para el desarrollo de nuevos antibióticos (Luna *et al.*, 2019).

La mayoría de los aislados clínicos de *Acinetobacter* multidrogo-resistente se tratan de *A. baumannii* o especies cercanas a esta como el complejo *Acb*, que infecta principalmente a los tractos urinario y respiratorio, piel, tejidos blandos y sangre, entre otros, así como contaminación de dispositivos protésicos y equipo médico. Actualmente cuentan con una elevada resistencia a múltiples antibióticos, lo cual aumenta su capacidad de supervivencia en ambiente hospitalario (Jeannot *et al.*, 2014; Bello-López *et al.*, 2019).

1.4 Tratamiento de infecciones causadas por *Acinetobacter*

El tratamiento para *Acinetobacter* solía darse con antibióticos como ceftriaxona, cefotaxima, ciprofloxacino, sulfonamidas, piperacilina y ticarcilina, los cuales mostraba efectividad *in vitro* e *in vivo* frente a algunos aislamientos clínicos (Vila *et al.*, 1993). Actualmente las infecciones causadas por *Acinetobacter* son generalmente tratadas con carbapenémicos debido a su elevada actividad sobre este organismo y por su perfil de seguridad favorable (Doi *et al.*, 2015).

Dependiendo de la resistencia que presentan las cepas de *Acinetobacter* aislada, se clasifican en: cepas multidrogo resistentes (MDR), que son aquellas cepas carentes de sensibilidad a uno o más antibióticos dentro de 3 o más categorías distintas de antibióticos, extremadamente drogo resistente (XDR) a aquellas cepas que no presentaron sensibilidad a uno o más antibióticos en todas las categorías a excepción de dos o menos categorías antibióticas diferentes y pandrogo resistentes (PDR) a aquellas cepas sin sensibilidad a ninguno de los antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012).

En los últimos años el surgimiento de cepas multidrogo resistentes tiene como consecuencia que la variedad de antibióticos que se pueden emplear sea reducida. Actualmente los antibióticos que presentan mayor actividad frente a *A. baumannii* son los carbapenémicos (Peleg *et al.*, 2008). A pesar de esto han surgido cepas resistentes a estos compuestos, lo que ha obligado al uso de otros antimicrobianos alternativos, actualmente entre las opciones de tratamiento que existen para *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) están:

Ampicilina-Sulbactam: Aun cuando se han encontrado cepas resistentes a esta terapia, como alternativa se puede administrar una dosis elevada de ampicilina-sulbactam como tratamiento efectivo a través de la saturación de la PBP (penicillin binding protein).

Polimixinas: las polimixinas B y E son usadas, pero debido a su toxicidad es recomendable usarlas en combinación con al menos otro agente (ampicilina-sulbactam) para el tratamiento de CRAB, además de que se ha reportado emergencia de resistencia durante la monoterapia con polimixinas (Bartal *et al.*, 2022).

Minociclina: se recomienda usarla en combinación con otros antibióticos como rifampicina, colistina y carbapenémicos, y a una dosis elevada de 200 mg cada 12h (Bartal *et al.*, 2022).

Tigeciclina: para las infecciones pulmonares, una alta dosis de tigeciclina (200 mg vía intravenosa seguida de 100 mg cada 12 horas) podría ser una opción para el tratamiento de infecciones pulmonares y sistémicas, teniendo una expectativa positiva. A dosis mayores de este agente no se observan diferencias en el tratamiento (Bartal *et al.*, 2022).

Rifamicina: según los datos, la sinergia entre la rifamicina y polimixinas podría reducir la emergencia de la resistencia, pero los limitados datos clínicos, la toxicidad conocida y las interacciones droga-droga, limitan su uso para infecciones por CRAB (Bartal *et al.*, 2022).

Fosfomicina: Actualmente ha aumentado el interés en las terapias de combinación que incluyen a la fosfomicina intravenosa para tratar a las cepas CRAB, pero no hay información suficiente para respaldar el uso de esta droga para el tratamiento de infecciones donde se encuentra amenazada la vida del paciente (Bartal *et al.*, 2022).

1.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Acinetobacter spp. cuenta con un gran número de mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos de los cuales podemos destacar:

1.5.1 Modificación del sitio diana

Dentro de este mecanismo se encuentran las mutaciones en los genes que codifican para las enzimas topoisomerasas, *gyrA* y *parC*, las cuales dan como resultado resistencia a quinolonas. (Nowak y Paluchowska, 2016). Otro mecanismo importante es el cambio en las PBP (*penicillin binding protein*), cuya función es la síntesis de la pared celular, este mecanismo confiere resistencia a los betalactámicos. También se encuentra la resistencia por protección ribosomal mediada por la proteína TetM, que confiere resistencia a tetraciclinas (Lee *et al.*, 2017).

1.5.2 Bombas de expulsión

Las bombas de eflujo son proteínas constituyentes de todas las membranas plasmáticas de las bacterias, las cuales reconocen y expulsan antibióticos al entorno impidiendo que se adhieran al sitio diana, una sobreexpresión de estas resulta en un fallo en la terapia antimicrobiana (Spengler *et al.*, 2017)

Se clasifican en seis super familias, de las cuales las seis están presentes en *Acinetobacter baumannii*: Small Multidrug Resistance (SMR), Resistance Nodulation Division (RND), Adenosine triphosphate-Binding Cassette (ABC), Multidrug y Toxic compound Extrusion (MATE), Major Facilitator Superfamily (MFS) y Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE), de las cuales las del grupo RND son las que se han encontrado en mayor medida y que le confieren capacidad de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y a biocidas como la clorhexidina (Nowak y Paluchowska, 2016). Las seis familias de bombas poseen fuentes de energía que se dividen en dos tipos: las que usan ATP como la superfamilia ABC, y

las que emplean un gradiente electroquímico también conocido como fuerza motriz de protones, que incluye a las superfamilias PACE, MATE, RND, SMR y MFS (Kapp *et al.*, 2018).

Las bombas de la familia RND se componen por una proteína transportadora localizada en la membrana interna, una porina y una proteína de membrana o de fusión. Esta familia sobresale del resto debido a su amplia variedad de sustratos, lo que otorga resistencia a antibióticos con diversas estructuras, *AdeABC* es la bomba característica de *A. baumannii*, donde las mutaciones en esta pueden generar resistencia a tigeciclina, gentamicina, cefotaxima, kanamicina, eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol, y el *AdelJK* es el segundo sistema encontrado en *A. baumannii* el cual confiere resistencia a betalactámicos, favoreciendo a la resistencia intrínseca de la bacteria (Nowak y Paluchowska, 2016).

1.5.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana celular

Las alteraciones en la permeabilidad celular se deben a unas proteínas llamadas porinas, las cuales forman canales en la membrana externa de las bacterias gram negativas, la función principal de las porinas es el transporte de proteínas del medio externo al espacio periplásmico a través de los canales que forman. En *A. baumannii* los canales formados por las porinas han reducido su tamaño, impidiendo el ingreso de antibióticos, incluyendo carbapenémicos (Singh *et al.*, 2013). Un mecanismo de resistencia a carbapenémicos intrínseco de *A. baumannii* consiste en la pérdida de la permeabilidad de la membrana, dada por alteraciones en la porina CarO (*carbapenem-associated outer membrane protein*), la cual es la principal porina en esta especie, aunque también intervienen porinas como OmpA, OmpF, OprD y HMP-AB (Vila *et al.*, 2007; Novovic *et al.*, 2015).

1.5.4 Inactivación o modificación del antibiótico

A. baumannii cuenta con un mecanismo característico que es la producción de beta-lactamasas, las cuáles actúan hidrolizando compuestos químicos que tienen un anillo beta-lactámico (antibióticos beta-lactámicos), teniendo como consecuencia la inactivación del compuesto antibacteriano. Las beta-lactamasas han sido clasificadas en 4 clases (A, B, C y D). Para las clases A, C y D, el sitio activo contiene

un residuo serina, mientras que las beta-lactamasas de la clase B son metaloenzimas dependientes de zinc (Vrancianu *et al.*, 2020).

A) Beta-lactamasas clase A

Algunas de estas enzimas son inhibidas por ácido clavulánico, y pueden hidrolizar penicilinas y cefalosporinas más eficientemente en comparación a los carbapenémicos, las beta-lactamasas clase A son la causa más frecuente de resistencia a beta-lactámicos. Las beta-lactamasas clase A que han sido encontradas en *A. baumannii* son: TEM, GES, CTX-M, SHV, SCO, PER, CARB, VEB y KPC, entre las cuales KPC y GES pueden presentar actividad carbapenemasa mediante mutaciones (Vrancianu *et al.*, 2020).

B) Beta-lactamasas clase B

Las beta-lactamasas clase B o metalo-beta-lactamasas, tienen la capacidad de hidrolizar casi todos los antibióticos beta-lactámicos incluyendo carbapenémicos excepto monobactámicos, siendo NDM, IMP y VIM las más frecuentemente reportadas en *A. baumannii* (Vrancianu *et al.*, 2020).

C) Beta-lactamasas clase C

Estas beta-lactamasas derivan del gen *ampC* encontrado en algunas enterobacterias, las beta-lactamasas clase C pueden conferir resistencia a cefalosporinas, penicilinas o cefamicinas, de las cuales la más prevalente en *A. baumannii* es AmpC no inducible denominada ADC (*Acinetobacter-derived cephalosporinase*) la cual es codificada en el cromosoma (Vrancianu *et al.*, 2020).

D) Beta-lactamasas clase D

También llamadas oxacilinasas (OXA) debido a su capacidad de hidrolizar oxacilina, poseen serina en su sitio catalítico. Este es el mecanismo de resistencia más importante en *A. baumannii*, los genes que codifican beta-lactamasas tipo OXA han sido identificados tanto en el cromosoma como en plásmidos, siendo OXA-51-like la beta-lactamasa clase D acarreada en el cromosoma solo en la especie *A. baumannii*. Otras oxacilinasas que también abundan en *A. baumannii* tanto en

cromosoma como plásmido son OXA-23-like y OXA-24/40-like (Vrancianu *et al.*, 2020).

1.6 Elementos genéticos móviles/movilizables

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal que pueden replicarse de manera independiente al cromosoma y tienen potencial de ser transferidos entre miembros de la misma especie e incluso bacterias distantemente relacionadas. Los plásmidos juegan un papel importante en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos entre géneros bacterianos incluido *A. baumannii*. Los plásmidos se encuentran compuestos por 4 módulos, 3 de ellos forman el *backbone* plasmídico también conocido como la región conservada, la cual se compone por los módulos de replicación, movilidad y estabilidad. El módulo restante se conoce como módulo accesorio, el cual corresponde a la región variable del plásmido, en el cuál pueden encontrarse genes de resistencia, de virulencia o para la producción de compuestos tóxicos (Brovedan *et al.*, 2020).

En la actualidad existe un esquema de tipificación de plásmidos de *Acinetobacter baumannii* basado en el replicón y los plásmidos de *A. baumannii* pueden clasificarse de esta manera (Bertini *et al.*, 2010). Sin embargo, es de utilidad emplear un esquema adicional de clasificación mediante las relaxasas MOB (Francia *et al.*, 2004).

Además de los plásmidos, existen otros elementos genéticos movilizables de menor tamaño conocidos como secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn), los cuales pueden desplazarse de una localización a otra dentro en un mismo replicón o entre replicones dentro de la misma célula. Las secuencias de inserción y transposones pueden ser transmitidos horizontalmente a otros genomas si se encuentran ligados a otros elementos móviles como plásmidos o fagos. Estos elementos juegan un papel importante en la plasticidad genómica y expresión genética, y son frecuentemente ligados a la movilización, interrupción o sobreexpresión de genes de resistencia (Salgado *et al.*, 2020).

2 ANTECEDENTES

La resistencia a antibióticos, incluyendo a los usados de último recurso como son los carbapenémicos, glicopéptidos y polimixinas, se ha convertido en un problema que involucra principalmente a los organismos patógenos del grupo ESKAPE, los cuales fueron designados con un “estatus prioritario”. Las infecciones por *A. baumannii*, ocurren en pacientes con un contacto cercano al sistema de salud y o en pacientes hospitalizados. Esta bacteria cuenta con desarrollo de multidrogo-resistencia y con mecanismos mejorados de persistencia en el ambiente hospitalario como la formación de biofilm, la resistencia a desecación mediante polisacáridos capsulares y la resistencia a desinfectantes como clorhexidina haciendo uso de la proteína de eflujo (Acel) (De Oliveira *et al.*, 2020; Harding *et al.*, 2018). El Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC), reporta que en Europa durante el año 2020 se observó que de 7622 aislados de *Acinetobacter* spp. el 97% presentaron resistencia a fluoroquinolonas, el 96% a aminoglucósidos y el 99% a carbapenémicos. En Estados Unidos, de acuerdo con el reporte de amenazas de resistencia a antibióticos del CDC se observa una disminución en los casos de *Acinetobacter* resistente a carbapenémicos del año 2013 al 2017 (de 11,700 casos en 2013 a 8,500 casos en 2017). En México la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en su informe anual de 2022 reporta a *A. baumannii* como el cuarto microorganismo principal aislado en brotes de IAAS.

Se han reportado alrededor del mundo diversos estudios sobre resistencia en *A. baumannii*, en el año 2019 en China, se realiza un análisis de 222 cepas colectadas en una unidad de cuidados intensivos del año 2010 al 2017, observando un incremento de las cepas CRAB del 25% al 92% del año 2010 al 2014. El genotipo de los aislados CRAB fue positivo para los genes: *bla*_{OXA23}, *bla*_{OXA51}, *bla*_{OXA24}, *bla*_{ADC}, *bla*_{TEM}, *ISAba1*, *ISA-23*, e *ISA-ADC*. Además, se observó que plásmidos con *bla*_{OXA-51} pueden ser transferidos mediante conjugación a especies no-*baumannii* (Zhao *et al.*, 2019).

Respecto a las carbapenemasas que son portadas por plásmidos, se ha visto que el gen *bla*_{NDM} también se puede transferir mediante vesículas de membrana externa entre miembros de *A. baumannii* y entre otras cepas como *Escherichia coli* de forma intacta, sin perder viabilidad y teniendo una alta actividad de transformación (Chatterjee *et al.*, 2017). El gen *bla*_{OXA-23} en cambio, es transferido más frecuentemente por plásmidos conjugativos, ya que al realizar ensayos de conjugación las bacterias receptoras resultan positivas para *bla*_{OXA-23} mediante el análisis de PCR (Hamidian *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). El gen *bla*_{OXA-72}, se ha encontrado en plásmidos pequeños de 16 kb o menos los cuales pueden ser transferidos vía transformación, además este gen se encuentra flanqueado por sitios de recombinación XerC/XerD los cuales regulan su expresión propiciando que la bacteria presente altos niveles de resistencia a carbapenémicos (Tamayo-Legorreta *et al.*, 2016; Narciso *et al.*, 2020). No existen muchos estudios respecto a plásmidos portadores de *bla*_{IMP}, hasta ahora se ha observado en plásmidos de hasta 200 kb e incluso se reportó en un plásmido de 313 kb. Esta beta-lactamasa por lo general se encuentra insertada en integrones (Saranathan *et al.*, 2014; Hendrickx *et al.*, 2022)

En cuanto a los estudios realizados en México, han sido pocos los que han abordado la resistencia mediada por plásmidos de *A. baumannii*. En uno de ellos se observaron cepas MDR, incluyendo resistencia a carbapenémicos, con el mismo perfil plasmídico, donde se presenta un linaje distribuido en el continente americano que produce beta-lactamasas de la familia *bla*_{OXA-23-like} y la familia *bla*_{OXA-40-like} (Cornejo *et al.*, 2020). En el estudio llevado a cabo por Mancilla-Rojano y colaboradores (2020), se observó que cepas del complejo Acb con la misma Secuencia Tipo, presentaron el mismo perfil plasmídico y perfil de resistencia.

En la actualidad, el número de plásmidos descritos en *A. baumannii* se ha ido incrementando, por lo que recientemente se ha propuesto el uso de los módulos de los plásmidos como herramienta de clasificación, específicamente la proteína llamada replicasa presente en el módulo de replicación, y la relaxasa del módulo de movilidad. Gracias a esto se ha observado que los plásmidos de *A. baumannii* tienen

un número restringido de linajes de acuerdo con los grupos de incompatibilidad plasmídica, y que algunas secuencias comparten tanto el módulo de replicación como el de mantenimiento, este último sirve para mantener un bajo número de copias de plásmidos (Salgado *et al.*, 2020).

En 2017 se analizaron plásmidos de menos de 10 kb, tomando en cuenta su diversidad genética y relaciones filogenéticas, encontrando que estos plásmidos son comunes en *A. baumannii*, y usualmente pertenecen a la superfamilia Rep_3, la cual se conoce como *repB* y se encuentra precedida de 3 a 6 directos repetidos conocidos como iterones. Estos plásmidos de la superfamilia Rep_3 también suelen portar genes para la movilización de plásmidos. Se observa en cambio que los plásmidos que pertenecen a la superfamilia Rep_1 cuentan con una replicasa sencilla, y de 2 a 5 genes de funciones desconocidas (Lean y Yeo, 2017).

Un análisis de las replicasas en plásmidos de *A. baumannii* en 2021, encuentra que la mayoría pertenecen a la superfamilia Rep_3. Al realizar dicho análisis se proponen 22 grupos nuevos de homología de replicasas para plásmidos de *A. baumannii* además de los 34 previamente establecidos, para así ampliar la diversidad de replicasas conocidas en este organismo (Castro-Jaimes *et al.*, 2021).

En el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, Bello-López realiza en 2019 estudio cepas de *Acinetobacter spp* provenientes del Hospital Para el Niño Poblano, donde observó a *A. haemolyticus* como el principal causante de infecciones. Detecta una cepa de *A. haemolyticus* (AN54) con cuatro plásmidos, entre ellos uno de 45.46 kb con *bla*_{NDM-1} insertada en un transposón compuesto similar a *Tn125* (Bello-López *et al.*, 2019). Por otra parte, en el mismo hospital en la unidad de quemados, se detectan 5 cepas resistentes a carbapenémicos pertenecientes al complejo Acb, estas cepas están genéticamente relacionadas y poseen cuatro plásmidos, presentando *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23}, (Bello-López *et al.*, 2020).

En el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, (Verdugo-Yocupicio, 2020) realiza un estudio en 25 cepas de *A. baumannii* MDR provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla, colectadas durante el periodo 2015-2019,

todas las cepas son portadoras de *bla*_{OXA-66} y *bla*_{OXA-72}, 3 cepas portaron *bla*_{OXA-23-like}, 9 cepas portaban *bla*_{NDM-like} y 1 de ellas *bla*_{IMP-like}. Se realiza la secuenciación completa del genoma de la cepa AE38, donde se determinó la presencia de un plásmido y se detecta *bla*_{OXA-66} y *bla*_{OXA-72}, también se lograron identificar sistemas de expulsión de la familia RND (Verdugo-Yocupicio, 2020). Estos dos trabajos demuestran que la búsqueda y caracterización de plásmidos portadores de genes de resistencia que son portados por cepas hospitalarias es una tarea que debe realizarse para vigilar la diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad *Acinetobacter baumannii* (MDR o resistente a carbapenémicos) es responsable del incremento de infecciones que se presentan en hospitales de México y de diversos países. Por esta razón, es importante determinar el entorno genético de las enzimas carbapenemasas que portan las cepas del *A. baumannii*, las cuales fueron estudiadas en trabajos previos en el LMHyC, así como caracterizar parcialmente los plásmidos que las portan. Además, de evaluar la participación de las bombas de expulsión en sus niveles de resistencia a quinolonas y betalactámicos.

4 OBJETIVO GENERAL

Determinar y caracterizar parcialmente plásmidos que acarrean carbapenemasa en *Acinetobacter baumannii*.

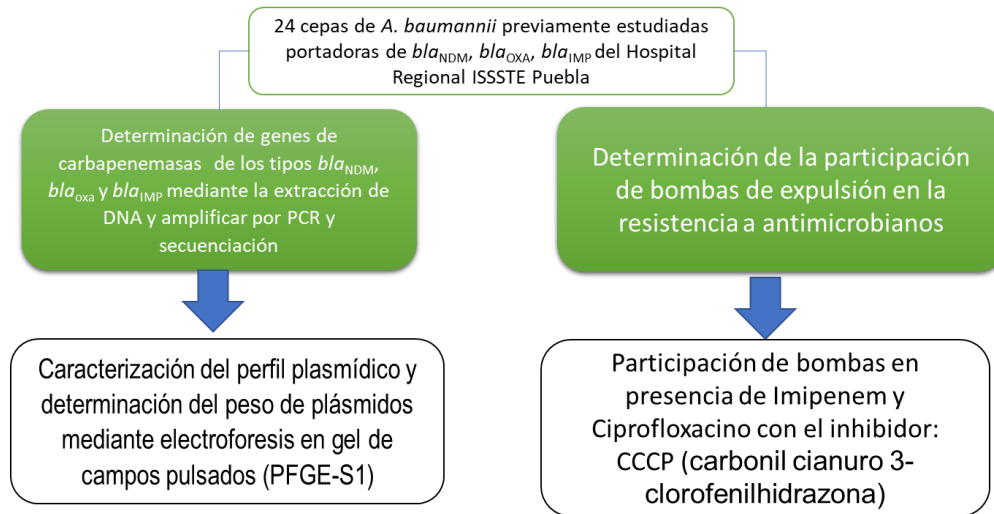
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES EXPERIMENTALES

1. Identificar genes (*bla_{NDM}*, *bla_{oxa}*, *bla_{IMP}*) que codifiquen enzimas con actividad carbapenemasa en cepas aisladas del hospital ISSSTE, Puebla.
2. Determinar el perfil plasmídico y peso molecular de los plásmidos.
3. Determinar la participación de bombas de expulsión en presencia y ausencia del inhibidor CCCP ante imipenem y ciprofloxacino.

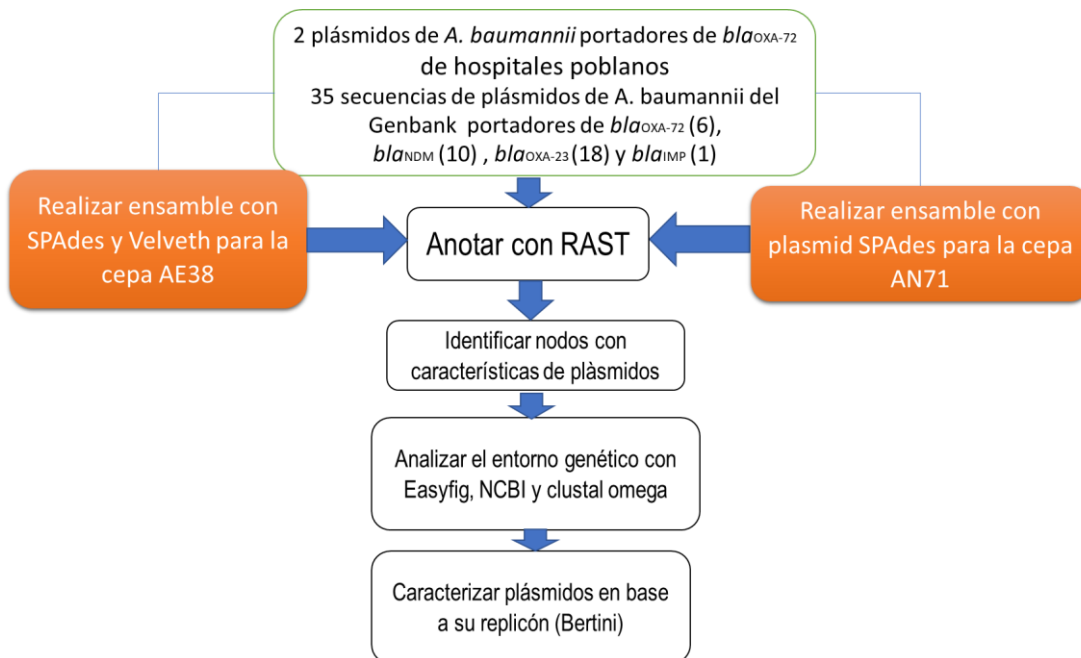
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES BIOINFORMATICOS

1. Descargar plásmidos del genbank portadores de genes que codifiquen enzimas con actividad carbapenemasa (*bla_{NDM}*, *bla_{oxa}*, *bla_{IMP}*)
2. Identificar los módulos del *backbone* de los plásmidos.
3. Identificar los entornos genéticos de las genes que codifican para enzimas con actividad carbapenemasa (*bla_{NDM}*, *bla_{oxa}*, *bla_{IMP}*) en los plásmidos
4. Caracterizar los plásmidos con base a su replicasa y relaxasa

5 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO EXPERIMENTAL



6 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO BIOINFORMÁTICO



7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Trabajo experimental

7.1.1 Cepas de estudio

Se trabajó con 24 cepas de *A. baumannii* del Hospital Regional ISSSTE Puebla portadoras de carbapenemasa previamente estudiadas por (Verdugo-Yocupicio, 2020) (**Figura 1**), las cuales fueron almacenadas a -70°C.

PFGE type	Susceptible a	Genotipo de resistencia				Participación de bombas de expulsión (PABN/CCCP)				Extracción de plásmidos	
		<i>bla</i> OXA	<i>bla</i> MBL	<i>ISAba48</i>	<i>ISAba125</i>	IPM	MEM	AN	CIP		
AE14	A	TE	66, 23, 72	-	-	-	-/ND	+/-	+/+	+/+	4
AE16	A1	SAM y TE	66, 23, 72	-	-	-	-/ND	-/ND	+/+	+/+	4
AE19	A2	SAM	66, 23, 72	<i>imp</i>	-	-	-/ND	+/-	+/+	-/ND	4
AE22	B	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	+/-	+/-	-/ND	+/+	1 ^v
AE23	B	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	+/-	+/-	-/ND	-/ND	1 ^a
AE25	B1	Ninguno	66, 72	-	+	-	+/-	-/ND	+/-	+/-*	1 ^v
AE26	C	Ninguno	66, 72	-	+	-	+/-	+/-	-/ND	+/-	1 ^v
AE28	C	Ninguno	66, 72	-	+	-	+/-	+/-	-/ND	-/ND	1 ^v
AE29	C	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	+/-	-/ND	-/ND	+/+	1 ^v
AE30A	C	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	1 ^a
AE30B	C	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	-/ND	+/-	-/ND	-/ND	1 ^a
AE32	C1	Ninguno	66, 72	-	+	-	+/-	-/ND	-/ND	-/ND	1 ^v
AE27	C2	SAM	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	-/ND	1 ^a
AE31	D	Ninguno	66, 72	-	+	-	+/-	+/-	-/ND	-/ND	1 ^a
AE37	E5	Ninguno	66, 72	-	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-	1 ^v
AE38	E4	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	+/-	-/ND	-/ND	-/ND	1 ^a
AE40	E3	Ninguno	66, 72	-	+	-	+/-	-/ND	-/ND	+/-*	1 ^v
AE41	E2	SAM	66, 72	-	+	-	+/-	-/ND	-/ND	-/ND	1 ^v
AE44	E1	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	-
AE45	E	Ninguno	66, 72	<i>ndm</i>	+	+	+/-	+/-	-/ND	-/ND	2
AE47	E	Ninguno	66, 72	-	+	-	+/-	-/ND	-/ND	-/ND	2
AE50	F	SAM	66, 72	-	+	-	-/ND	-/ND	+/-*	-/ND	2
AE51	F1	Ninguno	66, 72	-	+	-	-/ND	-/ND	-/ND	-/ND	2
AE48	G	SAM	66, 72	-	+	-	+/-	-/ND	-/ND	+/-	2

Figura 1. Características de las cepas reportadas por Verdugo-Yocupicio

7.1.2 Declaración ética

El protocolo del presente estudio fue revisado y aprobado por el comité de bioética del **Hospital Regional IS.S.S.T.E. Puebla**: Proyecto Núm. 188.2018. La información de los pacientes se manejó de manera anónima.

7.1.3 Cepas control

Se empleó la cepa de *E. coli* NCTC 50192 como referencia para la realización de campos pulsados (PFGE-S1), la cual contiene 4 plásmidos de 154 kb, 66 kb, 38 kb y 7 kb.

Para la determinación de la participación de bombas de expulsión se usó AN54 (*Acinetobacter haemolyticus*) como control positivo, y la cepa PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa*) como control negativo.

7.1.4 Extracción de ADN por el método de lisis por calor

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

7.1.5 Cuantificación de ADN

A los lisados se les realizó la cuantificación de ADN utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y usando la aplicación del instrumento, seleccionando la opción de ácidos nucleicos. Inicialmente el equipo realiza una verificación automática; se limpió el lector del equipo con papel y se procedió a hacer un blanco

con 2 μL de agua inyectable estéril, una vez que se activó la casilla (Measure), se procedió a la medición de los lisados, se fue limpiando el lector óptico entre muestras para evitar contaminaciones. Los lisados que resultaron muy concentrados se diluyeron con agua inyectable estéril hasta ajustarlos a una concentración final de 200 ng/ μL .

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

Se realizó una amplificación de genes de resistencia mediante PCR, para determinar la presencia y las variantes de *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-72}, presentes en las cepas.

Se empleó la cepa de *A. haemolyticus* AN54 como control positivo para *bla*_{NDM} e IS*Aba125-bla*_{NDM-1}. La cepa Ab23 como control positivo para *bla*_{OXA-23} y la cepa PE21 como control positivo para *bla*_{IMP}, debido a la falta de tiempo no se pudo realizar PCR para las cepas con *bla*_{OXA-72}.

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 1**.

Tabla 1. componentes de mezcla para la reacción de PCR para la amplificación de genes de resistencia con la enzima Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific)

Componentes	Concentración inicial	Volumen añadido por tubo (μL)	Concentración final de la reacción
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoScientific)	5U/ μL	0.08	0.04U
Buffer de reacción	10X	1	1X
MG+Cl ₂	25mM	1	2.55mM
dNTPs	10mM	0.3	0.3mM
Primer Forward	25 μM	0.3	0.75mM
Primer Reverse	25 μM	0.3	0.75mM
DNA	250 ng/ μL	1	25ng
Agua libre de nucleasas	---	Hasta 10 μL	---
Volumen final	---	10 μL	---

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 2**, para los oligonucleótidos de NDM (variantes) este puede usarse para detectar cualquier variante de *bla*_{NDM}-like

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la detección de carbapenemasas en cepas de *A. baumannii*

Nombre del gen	Tamaño del gen (pb)	Nombre del cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de Reacción	Referencia
bla <i>oxa-40</i>	828	oxa40Ps- F	GGTTAGTTGG+CCCCCTTAAA	249	95°C 5 min. 1c 94°C 25 seg 52°C 40 seg 30c 72°C 50 seg 72°C 6 min 4°C/	Fernández E. <i>et al.</i> , 2009
		oxa40Ps- R	AGTTGAG+CGAAAAGGGGATT			
oxa-24 like	828	oxa-24like-F oxa40Ps- F	GGTTAGTTGG+CCCCCTTAAA	256/249 alin	94°C 5 min. 1c 94°C 30 seg 48°C 30 seg 30c 72°C 45 seg 72°C 10 min 1 c	Novovic, <i>et al.</i> , 2015
		oxa-24like-R oxa40Ps- R	AGTTGAG+CGAAAAGGGGATT			
oxa-23 like	822	oxa-23like-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	94°C 5 min. 1c 94°C 30 seg 48°C 30 seg 30c 72°C 45 seg 72°C 1 min 1 c	Novovic, <i>et al.</i> , 2015
		oxa-23like-R	ATTTCTGACCG+CATTTCCAT			
ndm (variantes)	813	NDMv-F	AATATTATG+CACCCGGTCG+CG	732	94°C 5 min. 1c 94°C 1 min 54°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min 10°C/	Bello-López, 2015
		NDMv-R	CATCACGATCATG+CTGG+CCTT			
imp (variantes)	741	IMPd-F	CTRCCG+CAGWAGMGKCTTTG	515	94°C 5 min. 1c 94°C 1 min 56°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min 10°C/	Bello-López, 2015
		IMPd-R	G+CCADG+CTACDANATTTG+CGTC			
ISAba125-NDM	901	IsaBa125-R4	G+CAGTACGATCTTCAAAGT	901	95°C 5 min. 1c 95°C 1 min 53°C 1 min 30c 72°C 1 min 72°C 10 min 10°C/	Bello-López, 2019
		NDMv-R	CATCACGATCATG+CTGG+CCTT			

c. ciclo.

7.1.7 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se visualizaron tras realizar electroforesis en geles de agarosa al 1%, 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 10 segundos y lavados por 30 minutos en agua destilada; para visualizar los fragmentos de ADN, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro, Bio Imagen System.

7.1.8 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.

7.1.9 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/>)

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

7.1.10 Perfil plasmídico mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

El perfil plasmídico de las cepas fue determinado mediante la técnica de PFGE-S1 y usando la clasificación recomendada por (Tenover *et al.*, 1995), llevando a cabo los siguientes pasos usados en este trabajo:

a) Eliminación de exopolisacárido a partir de un cultivo bacteriano

A partir de un cultivo en placa de agar BHI al 3% (16 a 18 horas a 37°C), se cosecharon todas las células, se colocaron en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, que contenía 1 ml de solución estéril de EDTA 0.01 M. Se resuspendieron las células con ayuda de vórtex hasta quedar completamente homogéneas. Se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, posteriormente con una pipeta se extrajo todo el exopolisacárido (moviendo la pipeta en círculos para despegarlo y aspirarlo completamente). Las células fueron lavadas con 1 ml de SSI, se resuspendieron con vórtex y se centrifugaron por 5 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante, se añadió 1 ml de SSI, este proceso se repitió 2 veces más, el exceso de SSI se eliminó con una punta de micropipeta.

b) Preparación de insertos

Se hizo un lavado de las células con 1 ml de buffer TE estéril (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA pH=8.0) y se decantó nuevamente, el exceso de sobrenadante se eliminó con pipeta, finalmente se hizo una suspensión con buffer TE a una turbidez de 2 con el nefelómetro de Mac Farland.

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión, (Pulse Field Certified Low Melt Agarose, BioRad) al 2% en buffer TE y se distribuyó en tubos eppendorf estériles con 500µL por tubo, se colocaron en baño María a 54° C hasta su uso. Se mezclaron 250µL de agarosa con 250µL de suspensión bacteriana y se distribuyeron en moldes adecuados para hacer los insertos, dejándolos gelificar a 4°C al menos durante 10 min.

c) Lisis bacteriana

Se preparó una mezcla de la solución de lisis, considerando 1 ml de volumen final por reacción, es decir, por cada reacción se tomaron 995 µL de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH=8.0, 50 mM EDTA pH=8.0), 1% de sarcosil (0.01g) y 5 µL de proteinasa K (0.1 mg/ml). Se pesó el sarcosil en el tubo donde se realizó la mezcla agregando el buffer de lisis, se resuspendió por inversión suavemente para evitar la formación de burbujas hasta que se disolvió completamente, y finalmente se agregó

la proteinasa K, y se mezcló suavemente. Se preparó un volumen de mezcla de lisis dependiendo del número de muestras, se repartió 1 ml de la mezcla en tubos eppendorf y se colocaron dos insertos por tubo, se dejaron incubar en baño María a 54°C durante 24 h.

d) Lavado de insertos

Se eliminó el buffer de lisis sobre una placa petri estéril, se recuperaron los insertos y se colocaron en un tubo falcon con 10 ml de agua destilada, se incubó durante 10 min en baño María a 54°C; posteriormente se realizaron 3 lavados con 10 ml de buffer TE durante 30 min en las mismas condiciones (baño María a 54°C), en el último lavado los insertos se colocaron en un tubo eppendorf estéril con 1 ml de buffer TE, estos insertos se guardaron por una noche a 4°C, para proceder con la digestión.

e) Digestión y electroforesis

Se preparó una mezcla que contenía por reacción: 79.6 µL de agua, 20 µL del buffer de la enzima y 0.4 µL de la nucleasa S1 (8 U por inserto), se distribuyeron en cada tubo 100 µL y se agregó un cuarto de inserto, se incubó por 40 min a 37°C. Se preparó una mezcla con 150 µL de EDTA 0.5 M, pH 8 y 0.0015 g de sarcosil por reacción para parar la reacción. Se adicionó a cada tubo 150 µL de esta mezcla y se colocó en hielo durante 10 min. Los insertos digeridos se cargaron en el gel de agarosa que fue preparado y colocado en la cubeta de electroforesis con las siguientes condiciones: se utilizó una rampa de pulso que varió de 1 a 30 segundos durante 22 h a 6 V/cm y a 14°C. Se utilizó una cepa como control positivo con plásmidos de tamaño conocido: *E. coli* NCTC 50192 con cuatro plásmidos (154, 66, 48 y 7 kb).

7.1.11 Determinación de participación de bombas de expulsión en la resistencia a imipenem y ciprofloxacino

Para realizar la determinación de la participación de bombas de eflujo de la familia RND (*resistance-nodulation-division family*) en la resistencia a imipenem y

ciprofloxacino, se realizó CMI para imipenem y ciprofloxacino en presencia y ausencia de carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP, Sigma-Aldrich) a 25 mg/L. Este experimento se llevó a cabo en las cepas del trabajo de Verdugo-Yocupicio, 2020, en las cuales no fueron determinados estos valores. Los criterios fueron los mismos que el en trabajo previo, los cuales consisten en comparar los puntos de corte de las CMI en presencia y en ausencia del inhibidor de bombas de expulsión (EPI), y una disminución de 4 veces o más en el valor de la CMI en la presencia de CCCP, fue considerado como positivo en la participación de bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND en la resistencia a los antimicrobianos, aunque también inhibe a otras familias como MATE, SMR t MFS. El experimento se realizó por triplicado (Kumita *et al.*, 2009; Sánchez-Carbonel *et al.*, 2021). Se utilizó la cepa *A. haemolyticus* AN54 como control positivo, y la cepa *P. aeruginosa* PAO1 como control negativo.

7.2 Trabajo bioinformático

7.2.1 Base de datos de plásmidos

Se trabajó *in silico* con 35 plásmidos circularizados de *A. baumannii* portadores de diferentes carbapenemasas que fueron descargados del Genbank: 10 de ellos con *bla_{NDM}* reportados entre 2012 y 2019, 18 portadores de *bla_{OXA-23}* de los años 2011 y 2019, 6 plásmidos con *bla_{OXA-72}* de 2009 y 2017, y un solo plásmido con *bla_{IMP}* reportado en 2013. También se incluyeron 2 plásmidos secuenciados en el laboratorio; uno de la cepa de *A. baumannii* AE38 del Hospital regional I.S.S.S.T.E. Puebla colectada en marzo de 2018 y el otro de la cepa *A. baumannii* AN71 proveniente del Hospital para el Niño Poblano colectada en diciembre del 2016, los plásmidos de ambas cepas portaron *bla_{OXA-72}*.

7.2.2 Análisis bioinformático de plásmidos

Se utilizaron los siguientes programas para el análisis y comparación de los plásmidos:

Los ensamblajes de los genomas para determinar plásmidos se realizaron con los ensambladores: Velveth v1.2.10 (PLACNETw <https://castillo.dicom.unican.es/upload/>), SPAdes v. 3.9.0, SPAdes v. 3.11.1. Posteriormente los plásmidos se anotaron con RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) v.2.0 (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>). Las proteínas hipotéticas se analizaron con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) v 2.13.0 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de determinar si tenían una función o estaban identificadas, y para corroborar esta información se empleó pfam (<http://pfam.xfam.org/>) .

También se realizó una búsqueda de los genes de resistencia con la base de datos ResFinder v.3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)

Las relaxasas se determinaron mediante MOBscan (<https://castillo.dicom.unican.es/mobscan/>)

Para realizar la comparación de la estructura de los plásmidos se realizaron los dibujos de plásmidos y entornos genéticos mediante el programa Easyfig v2.2.2. El porcentaje de identidad de estos se determinó mediante BLAST.

El alineamiento de replicasas se hizo con Clustal Omega y dendrograma se realizó con el programa MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) v11.0.8. haciendo uso del esquema empleado por (Bertini *et al.*, 2010) y ampliado por (Salgado *et al.*, 2020)

8 RESULTADOS

Debido a la pandemia por Covid-19, el trabajo se dividió en dos partes: una parte experimental realizada entre los meses de enero a julio del 2022, y una *in silico* realizada a partir de agosto de 2020 hasta la conclusión de esta tesis.

8.1 Trabajo experimental

8.1.1 Determinación de variantes de carbapenemasas

Con la finalidad de determinar el tipo de variante de carbapenemasas en 24 cepas previamente trabajadas (Verdugo-Yocupicio, 2020), se realizó la amplificación de

los genes mediante PCR, encontrando que de 9 cepas portadoras de *bla*_{NDM}, el 100% mostraron una banda de amplificación, pero no pudieron purificar para mandar a secuenciar por falta de tiempo.

En las cepas AE14 y AE19, se logró amplificar el gen *bla*_{OXA-23}. El producto se envió a secuenciar y el análisis arrojó que se trata de la variante *bla*_{OXA-239}. Se determinó que la cepa AE19 también porta la variante *bla*_{IMP-5} (**Figura 2**).

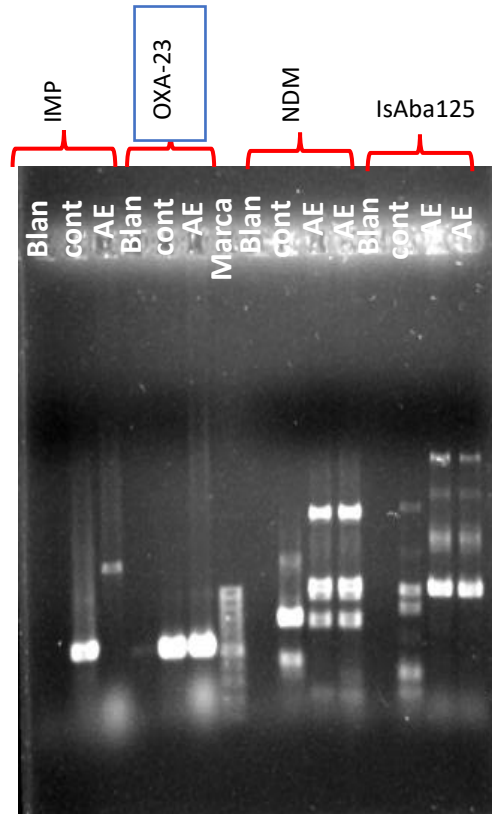


Figura 2. Corrimiento en agarosa al 1% de los productos de PCR de los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-23} y *bla*_{NDM} presentes en *A. baumannii*. Línea 1 y 2: Blanco y control positivo *bla*_{IMP} (505 pb); Línea 3: cepa AE19 negativa; Línea 4 y 5: Blanco y control positivo de *bla*_{OXA-23} (501 pb); Línea 6: cepa AE19 positiva; Línea 7 y 8: blanco y control positivo de *bla*_{NDM}; Línea 9 y 10: cepas positivas; Línea 11 y 12: blanco y control del arreglo ISAbA125-*bla*_{NDM} (901 pb); Línea 13 y 14 cepas AE29 y AE45 dudosas.

8.1.2 Perfil plasmídico de cepas de *A. baumannii*

Acinetobacter baumannii es particularmente capaz de adquirir y expresar nuevos mecanismos de resistencia en respuesta a la presión ejercida por los antibióticos. Dentro de estos mecanismos, es común la adquisición de carbapenemasas mediadas por plásmidos. A las cepas previamente se les determino la presencia de bandas plasmídicas por extracción alcalina (Verdugo-Yocupicio, 2020), por lo que en este trabajo se determinó el número de bandas plasmídicas y también el peso molecular de cada una de ellas por PFGE-S1.

En las **Figuras 3 y 4** se muestra el perfil plasmídico por PFGE-S1 donde se puede observar que 4 de las cepas presentan una sola banda plasmídica (AE29, AE41, AE44 y AE45) . En la **Tabla 3** se muestran Los datos de bandas plasmídicas reportadas por Verdugo-Yocupicio en 2020, los plásmidos encontrados por PFGE el peso probable en kilopares de bases de los plásmidos basados en la distancia de migración de las bandas comparado con las bandas de la cepa control.

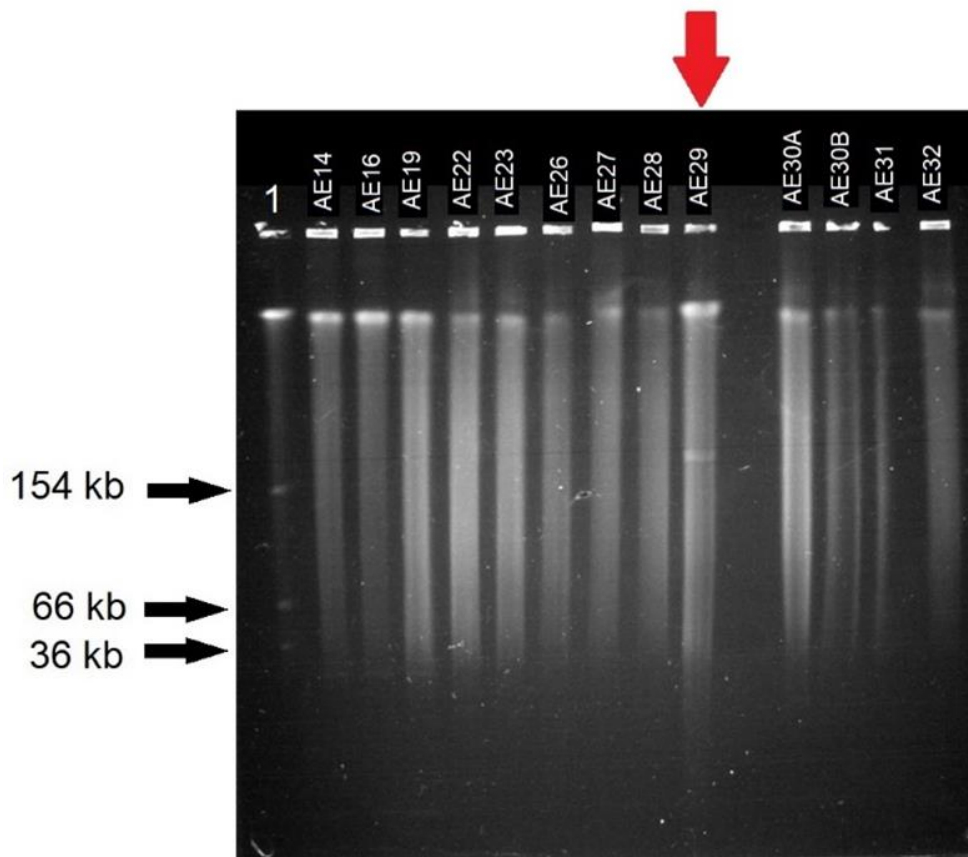


Figura 3 Visualización plasmídica por el método PFGE-S1 de 13 cepas de *A. baumannii* MDR aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla México. Línea 1: *E. coli* NCTC 50192 con 4 plásmidos: 154 kb, 66 kb, 38 kb y 7 kb (control de PM); Líneas 2-10: cepas de *A. baumannii*, Línea 11: vacío; Líneas 12-15: cepas de *A. baumannii*:

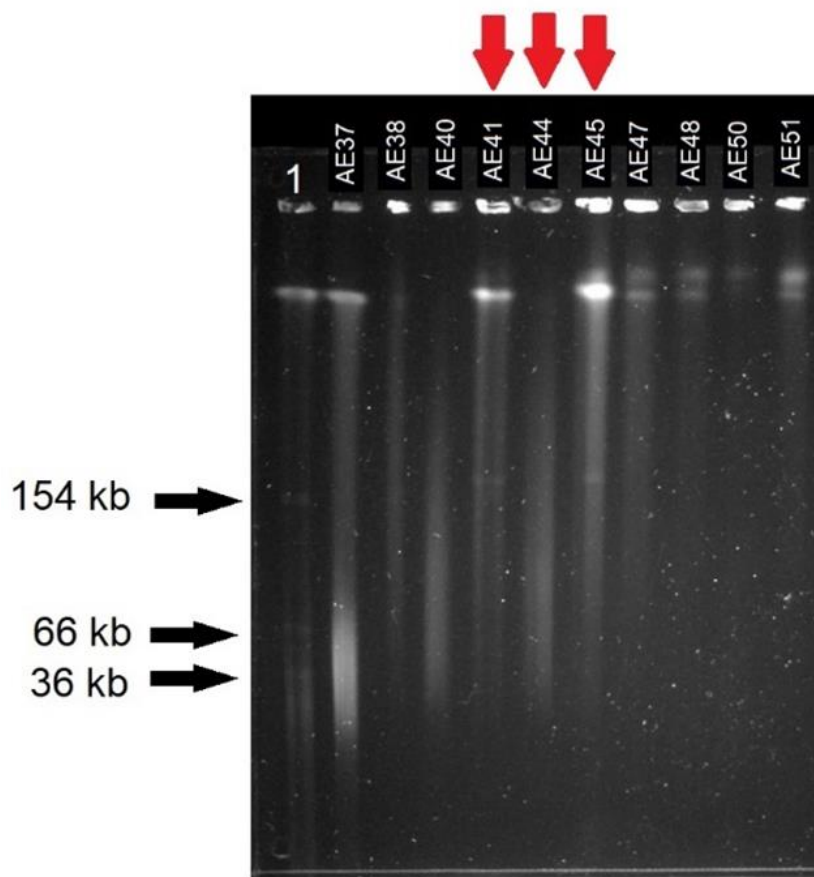


Figura 4 Visualización plasmídica por el método PFGE-S1 de 10 cepas de *A. baumannii* MDR aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla México. Línea 1: *E. coli* NCTC 50192 con 4 plásmidos: 154 kb, 66 kb, 38 kb y 7 kb (control de PM); Líneas 2-11: cepas de *A. baumannii*.

Tabla 3 Características plasmídicas de *Acinetobacter baumannii*

Cepa	Bandas plasmídicas previamente determinadas*	Bandas plasmídicas por PFGE	Peso molecular probable del plásmido (kb)	Genotipo de resistencia
AE14	4	-	-	<i>bla_{OXA-66}</i> , <i>bla_{OXA-72}</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>

AE16	4	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{OXA-23}
AE19	4	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{IMP}
AE22	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE23	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE25	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE26	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE27	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE28	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE29	1	1	205	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE30-A	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE30-B	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE31	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE32	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE37	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE38	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE40	1	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE41	1	1	191	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE44	0	1	191	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE45	2	1	191	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{NDM}
AE47	2	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE48	2	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE50	2	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}
AE51	2	-	-	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72}

* Verdugo-Yocupicio, 2020. En azul el número y peso de los plásmidos determinados en este estudio.

8.1.3 Determinación de bombas

En un inicio, uno de los objetivos de esta tesis era continuar caracterizando las cepas estudiadas por (Verdugo-Yocupicio, 2020), sin embargo, debido a las condiciones dadas por la pandemia, esto resultó complicado de cumplir. Debido al tiempo que pude entrar al laboratorio, se determinó el papel de las bombas de expulsión en la resistencia a imipenem y ciprofloxacino, para lo cual se determinó la CMI en presencia y ausencia del inhibidor Carbonil-Cianuro-3-Clorofenilhidrazona (CCCP) a 25 mg/L. Se consideró una disminución de 4 o más veces en el valor de

la CMI en presencia del inhibidor CCCP como fenotipo positivo a la participación de bombas de expulsión (Sánchez-Carbonel *et al.*, 2021).

Para el experimento de inhibición de bombas en presencia de imipenem, se trabajaron 8 cepas a las cuales no se les había determinado (AE14, AE16, AE19, AE30A, AE30B, AE44, AE50 y AE51) para el resto de las 16 cepas esta participación fue previamente determinada. Se observó que la cepa AE14 mostró una disminución de 4 veces el valor de la CMI (de 512 a 128 µg/ml); y la cepa AE16 mostró una disminución de 16 veces el valor de la CMI (de 512 a 32 µg/ml). En el caso de ciprofloxacino, se analizaron las 16 cepas puesto que estos valores no fueron determinados previamente, siendo analizadas las cepas: AE19, AE23, AE27, AE28, AE30A, AE30B, AE31, AE32, AE34, AE38, AE44, AE47, AE50 y AE51, en este caso se observó que solamente la cepa AE34 tuvo una disminución de 4 veces el valor de la CMI (de 4 a 1 µg/ml), lo cual puede considerarse como fenotipo positivo para la participación de bombas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Participación de bombas de expulsión en la resistencia a imipenem y ciprofloxacino en cepas de *A. baumannii*.

CEPA	IPM	IPM+CCCP	CIP	CIP+CCCP
AE14	512	128	PD	PD
AE16	512	32	PD	PD
AE19	512	256	256	128
AE23	PD	PD	128	64
AE27	PD	PD	128	128
AE28	PD	PD	128	64
AE30A	512	256	128	64
AE30B	512	256	128	64
AE31	PD	PD	128	64
AE32	PD	PD	128	64
AE34	PD	PD	4	1
AE38	PD	PD	128	64
AE44	512	256	128	64
AE47	PD	PD	128	64
AE50	512	256	256	128
AE51	512	256	256	128

Concentración mínima inhibitoria (CMI) en presencia y ausencia de Carbonil-Cianuro-3-Clorofenilhidrazona (CCCP). El color rojo corresponde a los valores de las cepas que disminuyeron 4 veces o más el valor de la CMI para considerarse como fenotipo positivo. El color azul corresponde

a aquellas cepas que no disminuyeron las veces necesarias el valor de la CMI para considerarse como fenotipo positivo. IPM. Imipenem. CIP. Ciprofloxacino. PD. Previamente determinado.

8.2 Trabajo bioinformático.

Debido a la pandemia por COVID-19, parte de esta investigación se hizo *in silico* mediante análisis bioinformáticos. Realizando la búsqueda de plásmidos de *A. baumannii* portadores de carbapenemasas, se hicieron comparaciones para determinar similitudes en el *backbone* de los plásmidos con otros, determinar los entornos de los genes que codifican para carbapenemasas y caracterizarlos de acuerdo con su replicasa y su relaxasa.

8.2.1 Análisis bioinformático de plásmidos portadores de *bla*_{OXA-23}

Se trabajaron con 18 secuencias de plásmidos portando *bla*_{OXA23} de *A. baumannii* del Genbank, la información de estos plásmidos se muestra en la **tabla 5**.

Todos los plásmidos descargados se seleccionaron ya que estaban completos y cerrados, descartando así a los plásmidos que no presentaron dichas características. El tamaño de los 18 plásmidos oscila entre 8 kb y 215 kb. Los plásmidos fueron reportados en cepas aisladas de países distribuidos entre los continentes americano, asiático, australiano y africano, y las cepas que los portan provenían de distintos sitios anatómicos a partir de muestras clínicas, donde los más frecuentes fueron el lavado bronquioalveolar (LAB) (3) y expectoración (5).

Tabla 5. Información de los plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{OXA-23} obtenidos de la base de datos Genbank.

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Tamaño plásmido (pb)	Contenido %G+C	País	Origen de la muestra	CDS	CDS con función predicha
pCMCVTab2-Ab66 (CP016302)	73,188	34	USA	Sin información	99	42
pCMCVTab2-Ab4 (CP016297)	74,090	34	USA	BAL	100	41

pAC29b (CP008851)	74,749	34	Malaysia	Secreción endotraqueal	97	44
HRAB-85 plasmid (CP018144)	77,513	34	China	Expectoración	99	38
pAB04-2 (CP012008)	87,569	34	Canada	Sangre	110	45
pUSA15_1 (CP020594)	98,301	34	South Korea	Expectoración	116	59
pA85-3 (CP021787)	86,334	34	Australia	expectoración	114	40
pAbPK1b (CP024578)	79,335	34	Pakistan	BAL ovino	104	38
tig00000059_pilon (CP026706)	72,105	34	Sin información	Sin información	98	32
unitig_2_pilon (CP026712)	72,990	34	Sin información	Sin información	99	32
AR_0056 plasmid unnamed2 (CP027121)	72,105	34	Sin información	Sin información	89	32
ABUH793 plasmid p74.1Kbp (CP035047)	74,091	34	Sin información	Sin información	100	34
ABUH763 plasmid p74.1Kbp (CP035052)	74,091	34	Sin información	Sin información	100	36
pTG22653 (CP039519)	127,784	41	Estados Unidos	BAL	138	56
pVB82_1 (CP050386)	215,278	39	India	Sangre	230	128
pVB2486_1 (CP050404)	99,090	35	India	Expectoración	118	53
pAb-D10a-a_3 (CP051872)	8,215	38	Ghana	Líquido cefalorraquídeo	13	8
pAb-B004d-c_3 (CP051878)	8,215	38	Ghana	Expectoración	12	8

%G+C. Porcentaje de guanina y citosina. BAL. Lavado Bronquioalveolar. CDS. Coding sequences

Se realizó el análisis de los plásmidos, destacando los módulos de su *backbone*, en la **tabla 6** se muestran el tamaño del plásmido y los genes correspondientes a cada módulo plasmídico, como son: el módulo de replicación módulos de estabilidad, de movilización y el módulo accesorio.

Se observó que de los 18 plásmidos portadores de *bla_{OXA-23}*, 14 de ellos poseen replicasa en el módulo de replicación, de los cuales 13 de ellos pertenecen al grupo GR6, un plásmido pertenece a GR25. En 4 de ellos no se detectó replicasa. Respecto al módulo de estabilidad se observó que presentan al menos una toxina, siendo la toxina zeta la más prevalente seguida por *HigB*. Los 14 plásmidos con replicasa también presentaron en el módulo de movilización T4SS y T4CP, lo cual indica podría tratarse de plásmidos conjugativos. Por otra parte, en 9 de estos plásmidos se observó que comparten en común la relaxasa MOB_F. En el módulo accesorio, se realizó el análisis del entorno genético de *bla_{OXA-23}* mediante RAST y BLAST, donde se pudo determinar la presencia de los transposones *Tn2008*, *Tn2006* y *Tn2007* (**Figura 5**), donde *Tn2008* se encontró en 12 plásmidos, *Tn2006* en 3 de ellos, *Tn2007* en los dos plásmidos más pequeños (8 kb), y en uno restante no se pudo determinar ya que la carbapenemasa se encontraba en uno de los extremos de la secuencia. Por otro lado, también se observó en algunos plásmidos la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (7), y en menor proporción genes de resistencia a tetraciclinas (2).

Tabla 6. Características del *backbone* de plásmidos portadores de *bla_{OXA-23}* de *A. baumannii* obtenidos de Genbank.

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Acceso Genbank	Tamaño plásmido (pb)	Módulo de Replicación	Módulo de Estabilidad	Módulo de Movilización	Módulo Accesorio
pCMCVTab2-Ab66 (CP016302)	CP016302	73,188	GR6	Toxin <i>higB</i>	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn incompleto, <i>bla_{OXA-23}</i>

pCMCVTab2- Ab4 (CP016297)	CP016297	74,090	GR6	<i>relE</i> , zeta toxin	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2008, <i>aphA6</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
pAC29b (CP008851)	CP008851	74,749	GR6	zeta toxin, <i>parA</i>	T4SS, T4CP	Tn2008, <i>tetR</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
HRAB-85 plasmid (CP018144)	CP018144	77,513	GR25	zeta toxin	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2008, <i>bla_{OXA-23}</i>
pAB04-2 (CP012008)	CP012008	87,569	GR6	Zeta toxin, toxin <i>relE</i> , <i>telA</i>	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2006, <i>bla_{OXA-23}</i>
pUSA15_1 (CP020594)	CP020594	98,301	GR6	zeta toxin, <i>higB</i> , <i>parA</i> , <i>parB/repB/ppo0J</i>	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2006, <i>aphA-6</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
pA85-3 (CP021787)	CP021787	86,334	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2006, <i>aphA-6</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
pAbPK1b (CP024578)	CP024578	79,335	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP	Tn2008, <i>aphA-6</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
tig00000059_ pilon (CP026706)	CP026706	72,105	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2008, <i>bla_{OXA-23}</i>
unitig_2_pilo n (CP026712)	CP026712	72,990	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP	Tn2008, <i>bla_{OXA-23}</i>
AR_0056 plasmid unnamed2 (CP027121)	CP027121	72,105	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2008, <i>bla_{OXA-23}</i>
ABUH793 plasmid p74.1Kbp (CP035047)	CP035047	74,091	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP	Tn2008, <i>aphA-6</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
ABUH763 plasmid p74.1Kbp (CP035052)	CP035052	74,091	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP	Tn2008, <i>aphA-6</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
pTG22653 (CP039519)	CP039519	127,784	Ausente	<i>parB</i>	No	Tn2008, <i>bla_{OXA-23}</i>

pVB82_1 (CP050386)	CP050386	215,278	Ausente	<i>relE</i> , <i>parA/parB</i>	<i>higA</i> , No	Tn2008, <i>aacA</i> , <i>aphE</i> , <i>strB</i> , <i>tetB</i> , <i>tetR</i> , <i>mph(E)/Mph(G)</i> , <i>bla_{PER-7}</i> , <i>qacE</i> , <i>cmIA</i> , <i>aadA</i> , <i>bla_{OXA-23}</i>
pVB2486_1 (CP050404)	CP050404	99,090	GR6	zeta toxin, <i>higB</i>	T4SS, T4CP, MOB _F	Tn2008, <i>bla_{OXA-23}</i>
pAb-D10a-a_3 (CP051872)	CP051872	8,215	Ausente	<i>higBA</i>	T4CP, MobA/MobL	Tn2007, <i>bla_{OXA-23}</i>
pAb-B004d- c_3 (CP051878)	CP051878	8,215	Ausente	<i>higBA</i>	T4CP, MobA/MobL	Tn2007, <i>bla_{OXA-23}</i>

Se muestra el tamaño del plásmido, grupos de homología por replicasa y módulos de los plásmidos. GR6, grupo de homología por replicasa; T4SS, sistema de secreción tipo IV; T4CP, proteína acopladora tipo IV.

Al analizar los entornos genéticos de *bla_{OXA-23}* mediante RAST, se observaron las siguientes estructuras:

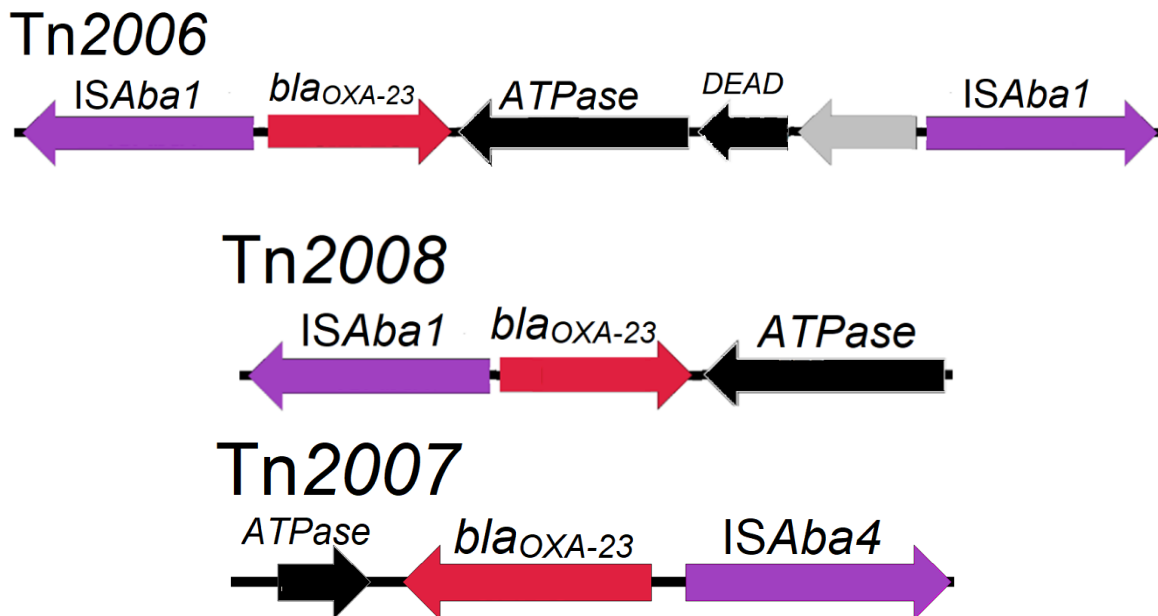


FIGURA 5. Transposones acarreando *bla_{OXA-23}* encontrados en este estudio mediante anotaciones de RAST y alineamientos con BLAST. Transposón *Tn2006* en pAB04-2, pUSA15_1

y pA85-3; *Tn2008* en pCMCVTA₂-Ab₄, pAC29b, HRAB-85 plasmid, pAbPK1b, tig00000059_pilon, unitig_2_pilon, AR_0056 plasmid unnamed2, ABUH793 plasmid p74.1Kbp, ABUH763 plasmid p74.1Kbp, pTG22653, pVB82_1, pVB2486_1; *Tn2007* en pAb-D10a-a_3 y pAb-B004d-c_3. Imagen construida con easyfig.

Para poder observar mejor las similitudes y diferencias de los plásmidos con respecto a su *backbone*, se realizó una comparación de los plásmidos mediante alineamientos múltiples con easyfig, tomando grupos de seis plásmidos que tuvieran tamaños similares para poder comparar y visualizar mejor las imágenes (Figura 6A,6B, 6C y 6D).

En la **Figura 6A** se muestra un grupo de 6 plásmidos que tienen un 34% de contenido en G+C, un tamaño entre 87 y 71 Kb. Estos plásmidos provienen de diferentes continentes, los primeros 4 plásmidos presentaron más de un 98% de identidad de acuerdo con BLAST, se encontró la proteína TraD y la relaxasa MOB_F.

En la **Figura 6B**. los 6 plásmidos presentan más de un 98% de identidad entre ellos según BLAST, tanto en su *backbone* como en el módulo accesorio, cabe destacar que todos estos plásmidos tienen un 34% en contenido de G+C, su tamaño se encuentra entre las 71 y 87 Kb, y son provenientes de diferentes continentes.

En la **Figura 6C** se observan 4 plásmidos que tienen regiones muy pequeñas en común como es en el módulo accesorio, donde comparten el transposón que flanquea a la *bla*_{OXA-23}, pero en cuanto a su *backbone* no hubo similitudes. Su contenido de G+C varía entre 34 y 41%, los tamaños van desde 74 Kb hasta los 215 kb. Los plásmidos son provenientes de América y Asia. Se observa que los 4 plásmidos no muestran un alto de grado de identidad entre sí.

En la **Figura 6D** se observan 2 plásmidos con un 100% de identidad, cuentan con el transposón que flanquea a la *bla*_{OXA-23}. Su contenido de G+C es de 38%, sus tamaños son de 8 kb y ambos plásmidos son provenientes del continente africano, en un mismo hospital, pero de pacientes diferentes en Ghana.

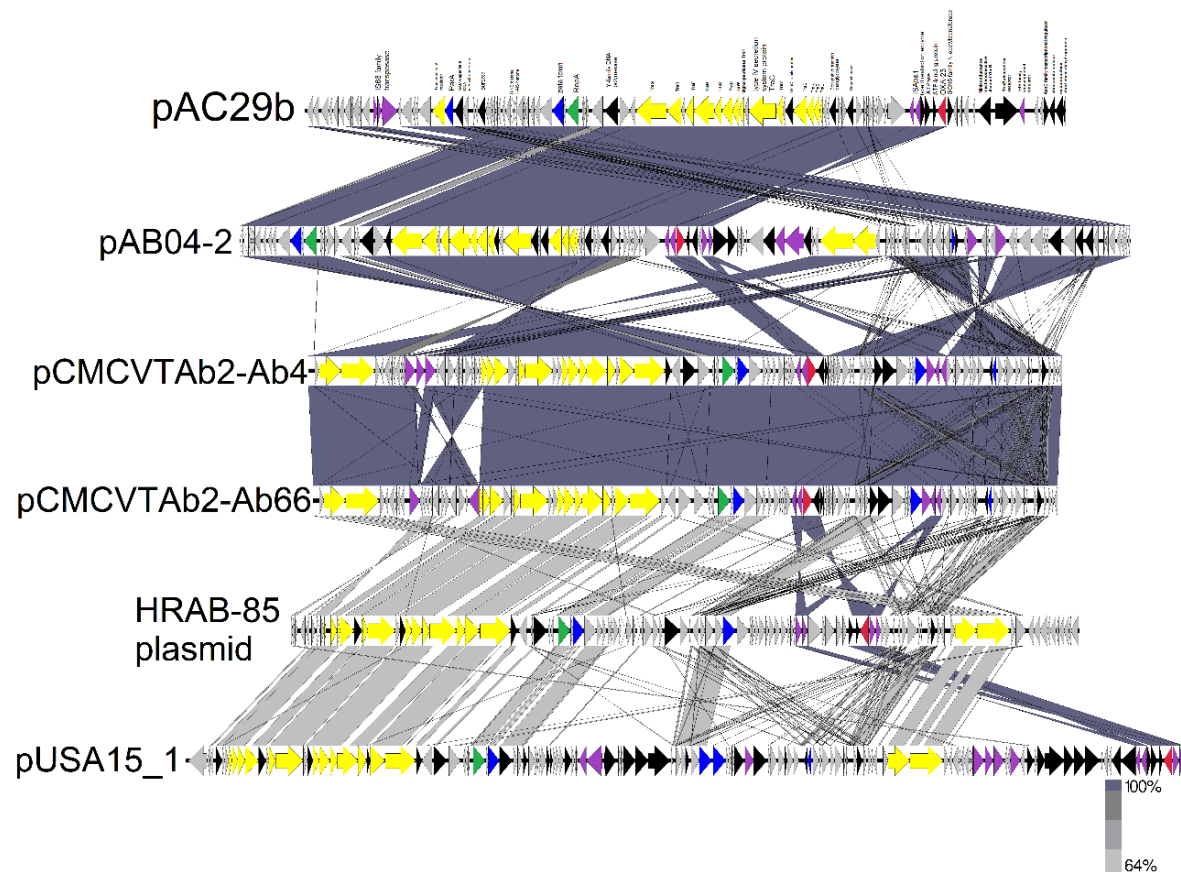


Figura 6A. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{OXA-23}. Alineamiento de plásmidos de tamaño entre 73 y 98 Kb se compararon por tener un tamaño similar. El contenido de G+C de todos es de 34%, además presentan la maquinaria completa del sistema de secreción tipo IV (T4SS) y la proteína acopladora tipo IV (T4CP), también presentan replicasa y sistemas toxina-antitoxina. Los primeros 4 plásmidos muestran un *backbone* similar respecto a los otros 2 plásmidos. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de estabilidad (azul), módulo de replicación (verde), módulo accesorio (morado), *bla*_{OXA-23} (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los números de acceso de cada plásmido son: CP008851, CP012008, CP016297, CP016302, CP018144 y CP020594 respectivamente.

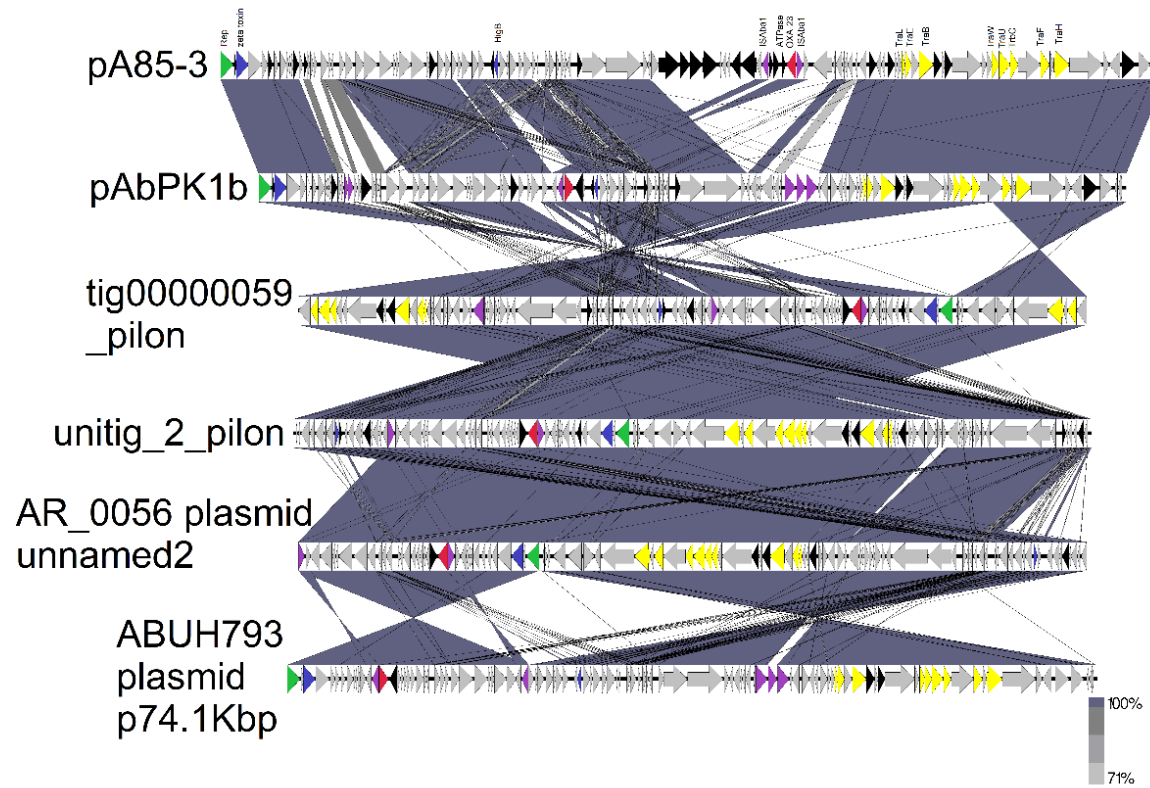


Figura 6B. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{OXA-23}. Los plásmidos se compararon por presentar tamaños similares de entre 72 y 86 kb. Todos los plásmidos presentan un 34% en contenido de G+C, tienen el mismo *backbone*, incluyendo la T4SS y la T4CP, tienen una replicasa presente y parte del sistema toxina-antitoxina. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de estabilidad (azul), módulo de replicación (verde), módulo accesorio (morado), *bla*_{OXA-23} (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los números de acceso de cada plásmido son: CP021787, CP024578, CP026706, CP026712, CP027121 y CP035047 respectivamente.

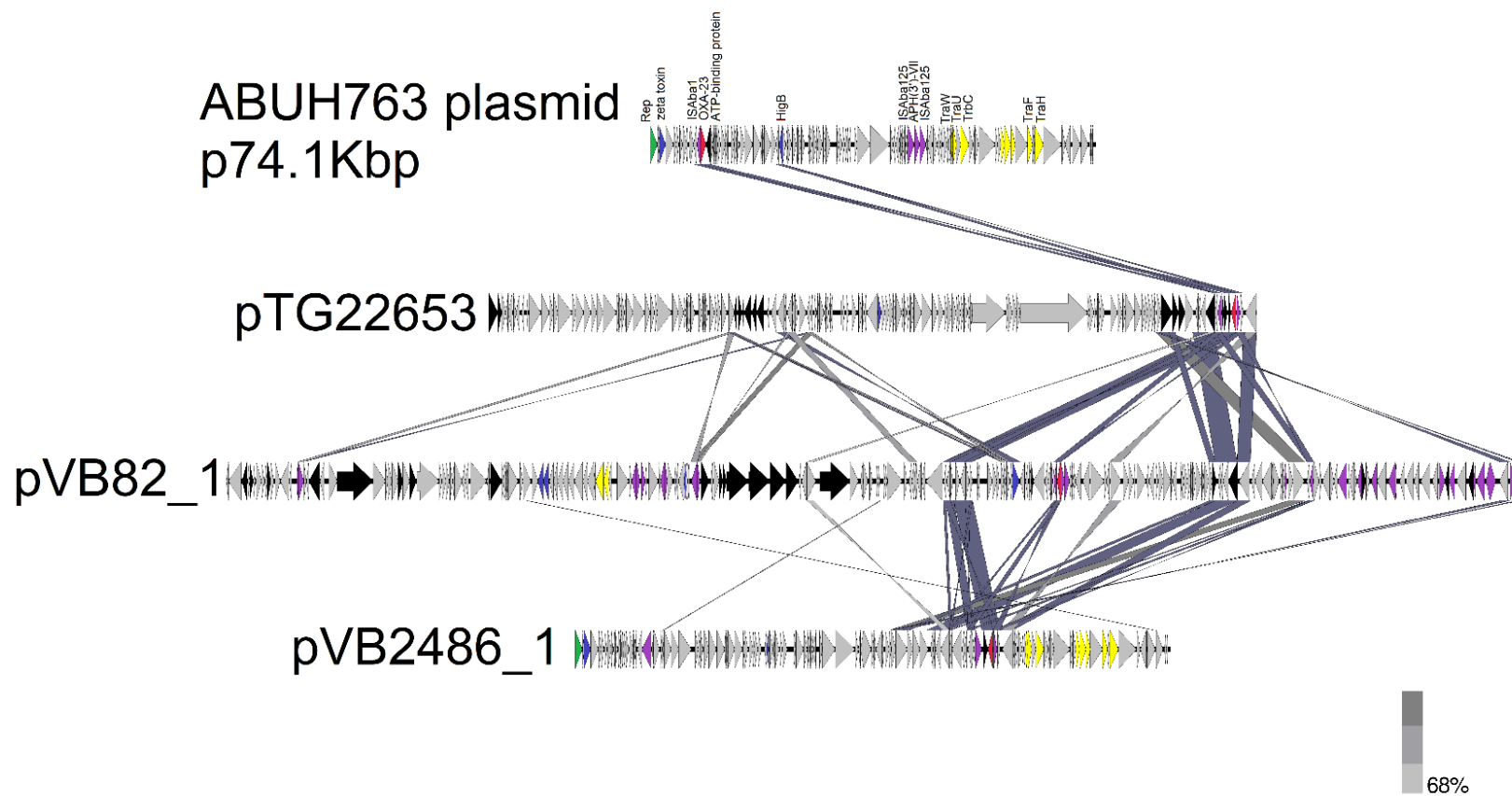


Figura 6C. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{OXA-23}. Estos plásmidos se compararon por tener los mayores tamaños que van de 74 a 215 kb, estos plásmidos no presentaron similitudes en su *backbone*. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de estabilidad (azul), módulo de replicación (verde), módulo accesorio (morado), *bla*_{OXA-23} (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los números de acceso de cada plásmido son: CP035052, CP039519, CP050386 y CP050404 respectivamente.

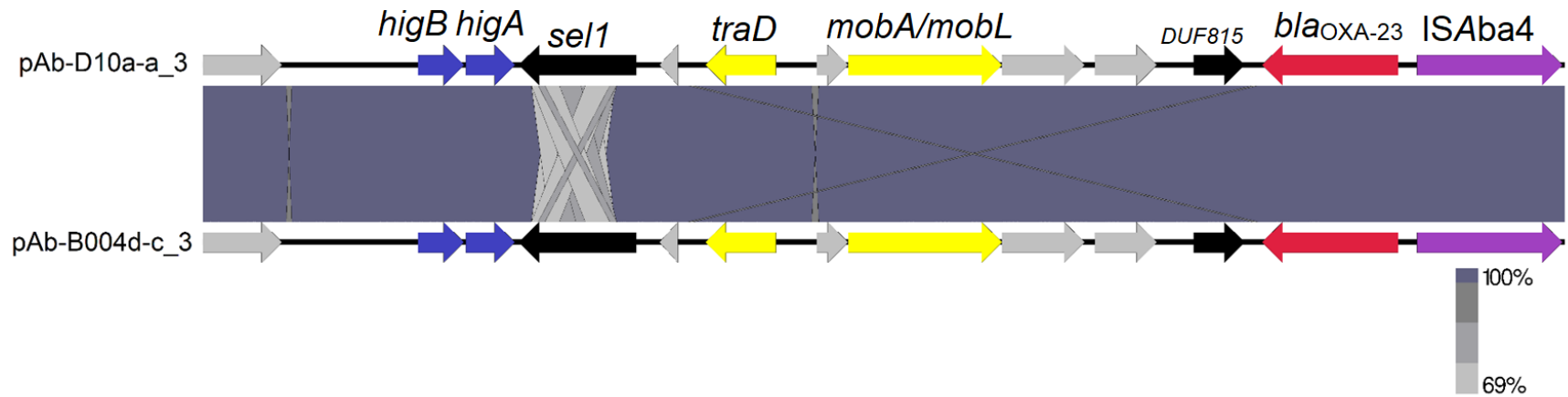


Figura 6D. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla_{OXA-23}*. Estos plásmidos fueron comparados por tener el mismo tamaño. Los plásmidos son idénticos de acuerdo con BLAST, portan el mismo sistema toxina-antitoxina, *bla_{OXA-23}*, y proteínas del módulo de movilización. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de estabilidad (azul), módulo accesorio (morado), *bla_{OXA-23}* (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los nombres de cada plásmido. pAb-D10a-a_3 y pAb-B004d-c_3 respectivamente.

Es importante señalar que todos los plásmidos de entre 70 y 100 kb podrían ser conjugativos de acuerdo con los resultados, ya que presentaron todos los genes del sistema de secreción tipo IV y la proteína acopladora tipo IV, además de un gen *rep* en el módulo de replicación, y en el módulo de estabilidad se encontraron *parA* y la toxina zeta. En los plásmidos de mayor tamaño (pTG22653 y pVB82_1) no se aprecian similitudes en el *backbone* ni proteína Rep, y los plásmidos de 8 kb (pAb-D10a-a_3 y pAb-B004d-c_3) fueron idénticos; estos plásmidos junto a *bla_{OXA-23}* portaron *ISAbA4* en lugar de *ISAbA1* y como en el resto de los plásmidos, tampoco presentaron Rep.

8.2.2 Análisis bioinformático de plásmidos portadores de *bla*_{NDM}

Se hizo una búsqueda en Genbank de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{NDM}, encontrando 10 secuencias completas de plásmidos portadores de esta beta-lactamasa cuya variante corresponde a *bla*_{NDM-1}, la información básica de los plásmidos se observa en la **Tabla 7**. El tamaño de los plásmidos va desde los 39 kb hasta 265 kb, fueron reportados en los continentes americano, africano y asiático. Las cepas portadoras de estos plásmidos fueron aisladas de sitios anatómicos como el recto, lavado bronquio alveolar, sangre, fluidos corporales, pus, entre otros.

Tabla 7. Información de plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1} de *A. baumannii* obtenidos de Genbank.

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Tamaño plásmido (pb)	Contenido %G+C	País	Origen de la muestra	CDS	CDS con función predicha
pNDM-0285 (CP026127)	39,359	46	Estados Unidos	Sin información	46	26
unnamed2 (CP027532)	41,087	38	Sin información	Sin información	46	32
p6200-47.274kb (CP010399)	47,274	54	Colombia	Fluido corporal	54	33
pAbNDM-1 (NC_019985)	48,368	43	Sin información	Sin información	53	39
unnamed2 (CP053220)	63,650	71	Tanzania	Muestra clínica	71	61
pDETAB2 (CP047975)	100,072	44	China	Hisopo rectal	108	88
pPM193665_1 (CP050416)	150,385	40	India	Pus	163	81
pPM194122_1 (CP050426)	150,385	40	India	BAL	162	83
pAC1633-1 (CP059301)	174,292	38	Malasia	Sangre	170	99

pABF9692 (CP048828)	264,805	39	China	Tráquea de un pato	251	113
--------------------------------	---------	----	-------	-----------------------	-----	-----

%G+C. Porcentaje de guanina y citosina. BAL. Lavado Bronquioalveolar. CDS. Coding sequences

Para poder observar mejor las similitudes y diferencias de los plásmidos con respecto a su *backbone*, se realizó una comparación de los plásmidos mediante alineamientos múltiples con easyfig, tomando grupos de seis plásmidos que tuvieran tamaños similares para poder comparar y visualizar mejor las imágenes (**Figura 8A y 8B**).

Se realizó el análisis de los plásmidos, destacando las partes del *backbone* de estos, en la **tabla 8**, se muestran el tamaño del plásmido y los genes correspondientes a cada uno de los cuatro módulos plasmídicos: el módulo de replicación, los módulos de estabilidad, movilización y el módulo accesorio. Se aprecia que solamente 2 plásmidos pudieron clasificarse en base a la replicasa, perteneciendo al grupo GR3. En el módulo de estabilidad de los plásmidos observamos que 7 de los 10 plásmidos cuentan con alguna parte del sistema toxina-antitoxina. En el módulo de movilización se pueden apreciar a 5 plásmidos que posiblemente sean conjugativos ya que poseen T4SS y T4CP, uno de los plásmidos carece de cualquiera de estas proteínas y 4 de ellos presentaron T4SS incompleto, entre los plásmidos catalogados como conjugativos, se aprecia que 4 de ellos poseen la relaxasa MOB_Q, y el plásmido restante posee MOB_P, los 5 plásmidos restantes no poseen relaxasa. En el módulo accesorio al analizar el entrono genético de *bla*_{NDM-1} se pudo apreciar que en todos los plásmidos el gen se encuentra insertado en el transposón Tn125 (**Figura 7**) el cuál se caracteriza por estar flanqueado por las secuencias de inserción IS_{Aba125}, poseen *bla*_{NDM-1}, un gen de resistencia a la bleomicina y las chaperonas GroEI y GroES. Además de *bla*_{NDM-1}, también se observó en todos los plásmidos la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas y en los plásmidos más grandes se aprecia la presencia de todos los genes de resistencia antibiótica mencionados (**CP050416 y CP050426**) (**Tabla 8**).



Figura 7. Transposón *Tn125* encontrado en todos los plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1}. La única variante encontrada fue *bla*_{NDM-1}. *groEL*, *groES*, chaperonas; TAT (twin arginine transporter); *ble*, gen de resistencia a la bleomicina.

Tabla 8. Características del *backbone* de plásmidos portadores de *bla*_{N_{DM}} de *A. baumannii* obtenidos de Genbank

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Acceso Genbank	Tamaño plásmido (pb)	Módulo de Replicación	Módulo de Estabilidad	Módulo de Movilización	Módulo Accesorio
pNDM-0285 (CP026127)	CP026127	39359	No	zeta toxin	T4SS, T4CP, MOB _Q	Tn 125 incompleto, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>aphA-7</i>
unnamed2 (CP027532)	CP027532	41,087	No	no	T4SS, T4CP, MOB _Q	Tn 125 incompleto, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>aphA-7</i>
p6200-47.274kb (CP010399)	CP010399	47,274	No	zeta toxin	T4SS, T4CP, MOB _Q	Tn 125, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>aphA-7</i>
pAbNDM-1 (NC_019985)	NC_019985	48,368	No	zeta toxin	T4SS, T4CP, MOB _Q	Tn 125, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>aphA-7</i>
unnamed2 (CP053220)	CP053220	63,650	No	no	T4SS, T4CP, MOB _P	Tn 125 incompleto, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>aac(3)-lid</i> , <i>bla</i> _{CARB-15} , <i>aphA-7</i>
pDETAB2 (CP047975)	CP047975	100,072	No	<i>hipA</i> , <i>relE/parE</i> , <i>brnA</i> , <i>brnT</i> , <i>relB/stbD</i> , <i>relE/stbE</i> .	no	Tn 125, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>aac(3)-lid</i> , <i>bla</i> _{OXA-58} , <i>sul2</i> , <i>mph(E)</i> , <i>tetR/acrR</i> , <i>tet(39)</i>
pPM193665_1 (CP050416)	CP050416	150,385	GR3	<i>abiEii/abiGii</i>	T4SS incompleto	Tn 125, integrón clase 1, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>mphE</i> , <i>sul1</i> , <i>qacE delta 1</i> , <i>cmlA5</i> , <i>ant(3'')-</i> <i>la</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(6)</i> , <i>aph(3'')</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tetR(B)</i>
pPM194122_1 (CP050426)	CP050426	150,385	GR3	<i>abiEii/abiGii</i>	T4SS incompleto	Tn 125, integrón clase 1, <i>bla</i> _{N_{DM}} -1, <i>ble</i> , <i>mph(E)</i> , <i>sul1</i> , <i>qacE delta 1</i> , <i>cmlA5</i> , <i>arr-2</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(6)-ld</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>tetR/acrR</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tetR(B)</i>

pAC1633-1 (CP059301)	CP059301	174,292	No	zeta toxin	T4SS incompleto	Tn 125, <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>ble</i> , <i>adeB/adeJ</i> , <i>adeC/adeK/oprM</i> , <i>aac(3)-IId''</i> , <i>sul2</i> , <i>tetR/acrR</i>
pABF9692 (CP048828)	CP048828	264,805	No	no	T4SS incompleto	Tn 125, <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>ble</i> , <i>tet(M)</i> , <i>bla</i> _{OXA-58} , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aph(3')-Via</i> , <i>floR</i>

GR6, grupo de homología por replicasa; T4SS, sistema de secreción tipo IV; T4CP, proteína acopladora tipo IV

Para los plásmidos portadores de *bla*_{N_{DM}-1} se realizaron alineamientos múltiples en 2 grupos de 5 plásmidos cada uno seleccionados de acuerdo con su tamaño, el primer grupo de plásmidos presenta un tamaño entre 39 Kb hasta 63 Kb (**Figura 8A**) y el segundo grupo tiene un tamaño entre 100 Kb hasta 265 Kb (**Figura 8B**).

En la **Figura 8A**, se observa un grupo de 5 plásmidos portadores de *bla*_{N_{DM}-1}, 2 plásmidos provenientes del continente americano, 1 del continente africano, y otros 2 cuya procedencia no se halló en la base de datos. En los alineamientos 4 de los 5 plásmidos presentaron un 99.99% de identidad de acuerdo con BLAST, donde se aprecia que comparten genes del sistema de secreción tipo IV, la toxina zeta, un sitio *parA*, y una enzima modificadora de aminoglucósidos. Estos 4 plásmidos fueron los más pequeños en tamaño (39 Kb hasta 49 Kb) su contenido de G+C 37% hasta 41%, y el más grande cuyo tamaño es de 63 Kb presentó un contenido de G+C de 43%, se observa que este plásmido grande presenta más genes en el módulo accesorio (morado), y en cuanto a su *backbone*, este es distinto al resto de plásmidos.

En la **Figura 8B**, se observan alineamientos múltiples de plásmidos con *bla*_{N_{DM}-1} aislados en el continente asiático como son los países India, 2 del mismo hospital (plásmidos pPM193665_1 y pPM194122_1) pero no se sabe si del mismo paciente, China de 2 ciudades diferentes y Malasia. Se encontró que los 2 plásmidos provenientes de la India (pPM193665_1 y pPM194122_1) presentaron un 100% de identidad de acuerdo con el BLAST, destacando que ambos presentaron el mismo contenido de G+C (40%), y comparten el mismo contenido de pares de bases (150,385), el resto de plásmidos no presentaron características similares en su *backbone*, solamente se asemejan en la región variable donde se encuentra insertada *bla*_{N_{DM}-1}.

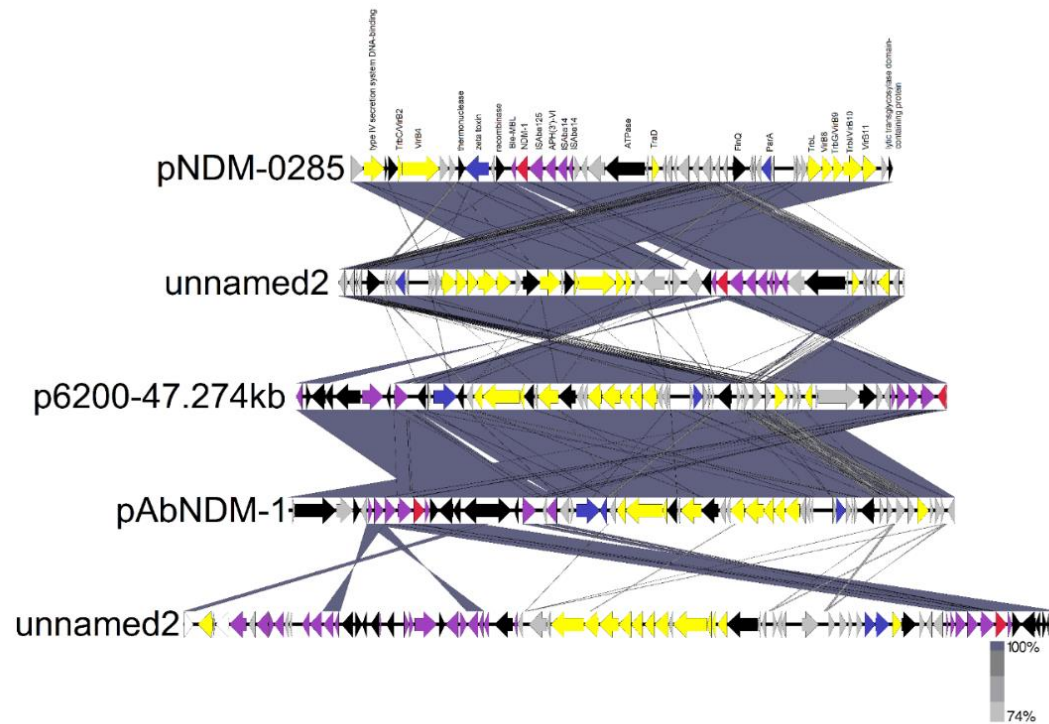


Figura 8A. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de bla_{NDM-1} . Los plásmidos cuentan con un tamaño que va desde las 39 kb hasta las 63 kb, con un contenido G+C de entre 37 y 43%, presentan la maquinaria completa del T4SS y una T4CP, todos carecen de replicasa, portan sistemas T-A. Los primeros 4 plásmidos presentaron un *backbone* similar, mientras que el quinto difirió del resto. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de estabilidad (azul), módulo de replicación (verde), módulo accesorio (morado), bla_{NDM} (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los números de acceso de cada plásmido son: CP026127, CP027532, CP010399, NC_019985 y CP053220.

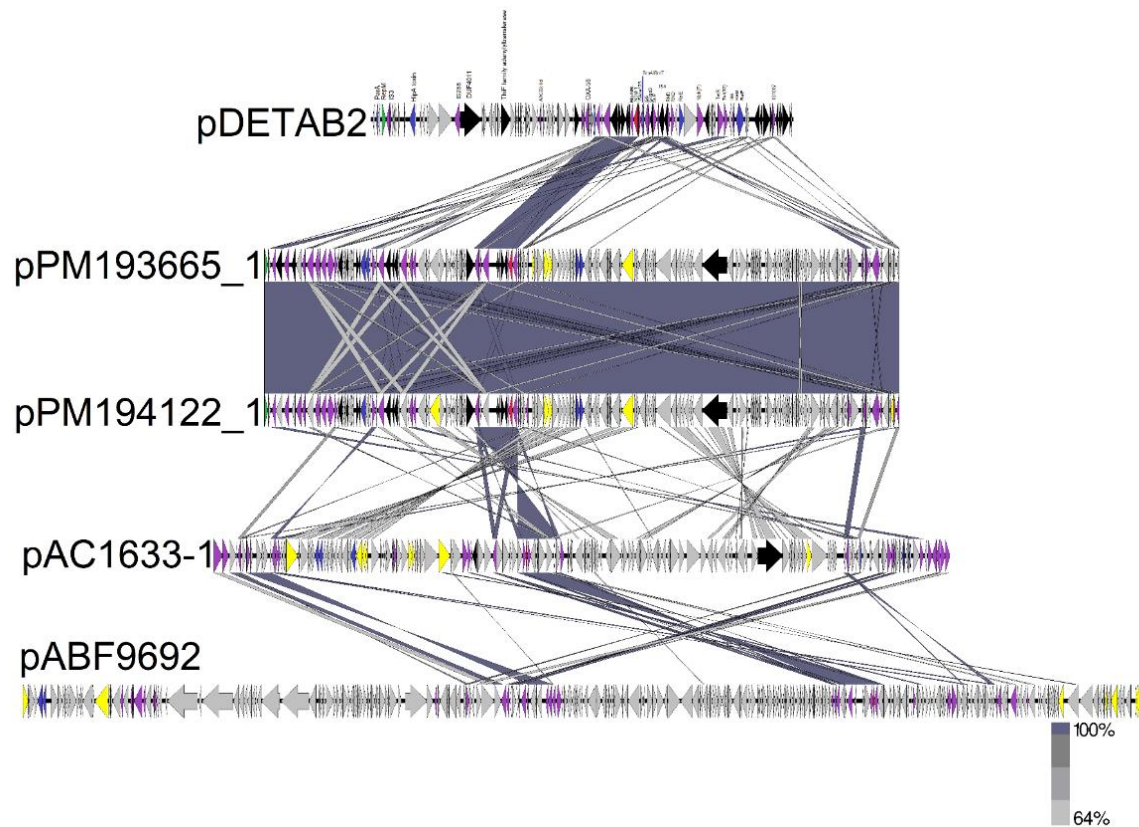


Figura 8B. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{NDM-1}. Los plásmidos tienen un tamaño que va desde las 100 hasta las 264 kb, con un contenido G+C de entre 38 y 44%, presentan una T4CP. Dos de los 5 plásmidos presentan replicasa, todos contaron con sistemas T-A. Solo 2 plásmidos presentan un *backbone* similar, mientras que el resto son diferentes. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de estabilidad (azul), módulo de replicación (verde), módulo accesorio (morado), *bla*_{NDM-1} (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los números de acceso de cada plásmido son: CP047975, CP050416, CP050426, CP059301 y CP048828.

En general los plásmidos portadores de *bla*_{NDM-1}, tienen un *backbone* similar en aquellos plásmidos de tamaños menores a 50 kb y además cuentan con la maquinaria completa para la conjugación, los plásmidos de mayor tamaño fueron distintos en su *backbone*, pero en todos se encontró el transposón *Tn125*.

8.2.3 Análisis bioinformático de plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72}

Se trabajó con un total de 8 plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72}, de los cuales 6 son provenientes del Genbank, y 2 plásmidos fueron proporcionados por el LMHyC, 1 de ellos de una cepa aislada de líquido sinovial en un paciente del Hospital para el Niño Poblano y otra cepa de un paciente del Hospital Regional ISSSTE Puebla, tomada de una muestra de expectoración. La información básica de los plásmidos se muestra en la **tabla 9**.

El tamaño de los plásmidos se encontró entre los 7 y los 10 kb, de los cuales 5 plásmidos fueron aislados de cepas en México, los cuales contaron con más del 99.9% de identidad, otro plásmido proviene de Estados Unidos, uno de China y otro de Malasia, entre estos 3 últimos hubo un 94% de identidad. Respecto a los sitios anatómicos de aislamiento, todos fueron aislados de distintos sitios como sangre, expectoración o herida y uno del suelo. No se detectaron otros genes de resistencia además de *bla*_{OXA-72}. Cabe destacar que en el plásmido pAB120 (N° de acceso CP031446) se encontraron dos genes de *bla*_{OXA-72}.

Tabla 9. Información de los plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72} de *A. baumannii* obtenidos de Genbank .

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Tamaño plásmido (pb)	Contenido %G+C	País	Origen de la muestra	CDS	CDS con función predicha
pAbaAE38 (S/N)	10,017	35	México	Expectoración	13	6
pAbaAN71 (S/N)	9,990	35	México	líquido sinovial	13	8
pAba9201a (CP023021)	9,024	35	México	sangre	11	6

pAba10042a (CP023027)	10,062	35	México	secreción	12	7
pAba5845a (CP023035)	9,935	35	México	herida	13	7
pK09-14 (CP043954)	10,879	34	USA	Músculo de pierna derecha	13	10
pA52-OXA-72 (CP034097)	7,791	34	Malaysia	suelo	11	6
pAB120 (CP031446)	8,493	33	China	expectoración	11	7

%G+C. Porcentaje de guanina y citosina. CDS. Coding sequences

Las secuencias de plásmidos se anotaron con RAST para posteriormente determinar los módulos de los plásmidos (**tabla 10**) y caracterizarlos.

Se aprecia que los 5 plásmidos originarios de México compartieron el mismo *backbone*, teniendo así la misma replicasa (GR29) y relaxasa (MOB_Q). también se observa que el tamaño de estos se encuentra entre las 9 y 10 kb, sugiriendo que en el país *bla*_{OXA-72} se moviliza en plásmidos con la misma estructura, a diferencia de los 3 plásmidos restantes que provienen de distintos países y no comparten la misma estructura. Interesantemente, el plásmido de mayor tamaño (10 kb) cuenta con dos copias de *bla*_{OXA-72}.

Tabla 10. Características del *backbone* de plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72} en *A. baumannii* obtenidos de Genbank

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Tamaño plásmido (pb)	Módulo de Replicación	Módulo de Estabilidad	Módulo de Movilización	Módulo Accesorio
pAbaAE38 (S/N)	10017	GR29	No	MOB _Q	<i>ISAba48</i> , <i>bla</i> _{OXA-72}
pAbaAN71 (S/N)	9,990	GR29	No	MOB _Q	<i>ISAba48</i> , <i>bla</i> _{OXA-72}
pAba9201a (CP023021)	9,024	GR29	No	MOB _Q	<i>ISAba48</i> , <i>bla</i> _{OXA-72}
pAba10042a (CP023027)	10,062	GR29	No	MOB _Q	<i>ISAba48</i> , <i>bla</i> _{OXA-72}
pAba5845a (CP023035)	9,935	GR29	No	MOB _Q	<i>ISAba48</i> , <i>bla</i> _{OXA-72}
pK09-14 (CP043954)	7,791	GR2	<i>higB</i> , <i>higA</i>	No	<i>bla</i> _{OXA-72}

CP043954 (CP034097)	8,493	GR7	No	No	<i>bla</i> _{OXA-72}
pA52-OXA-72 (pAB120)	10,879	GR2	<i>higB, higA, brnT, brnA</i>	No	Dos copias de <i>bla</i> _{OXA-72}

Grupos de homología en base a la replicasa GR29, GR2 y GR7; relaxasa MOB_Q; Toxinas y antitoxinas HigB, HigA, BrnT, BrnA. La clasificación se realizó de acuerdo con los genes presentes en el *backbone* del plásmido ya que los tamaños son similares.

Respecto al entorno genético de *bla*_{OXA-72}, esta carbapenemasa se encuentra flanqueada por sitios XerC/XerD en todos los plásmidos.

En cuanto a la estructura completa de los plásmidos, se realizó una comparación de ellos mediante alineamientos múltiples con easyfig en 2 grupos con 5 y 3 plásmidos ya que de ese modo se podrían visualizar mejor las imágenes, además se eligieron estos grupos por presentar los mismos genes como se observa en las imágenes (Figuras 9A y 9B), pero para conocer el porcentaje de identidad de estos plásmidos se empleó BLAST.

En la **Figura 9A** se observa un grupo de 5 plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72}, todos originarios de México, que comparten el mismo *backbone* como son la relaxasa, la replicasa y el *oriV*, así como el elemento IS*Aba48* y *bla*_{OXA-72} en el módulo accesorio.

En la **Figura 9B** se muestran alineamientos múltiples de 3 plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72}, los cuales no muestran genes del módulo de movilización, pero sí del módulo de estabilidad como lo son los sistemas toxina-antitoxina.

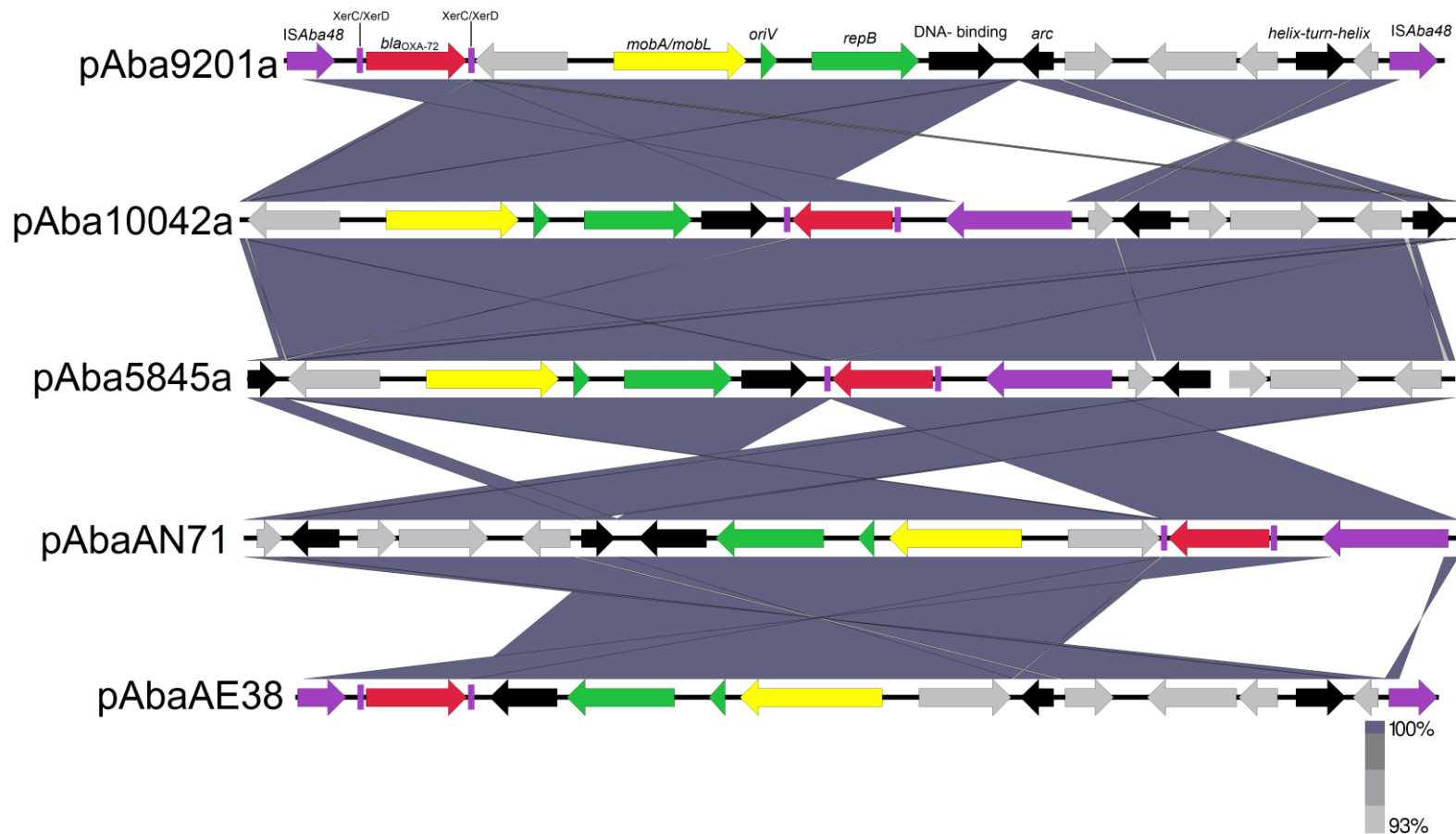


Figura 9A. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{OXA-72}. Plásmidos con un tamaño entre 9 y 10 Kb seleccionados por su grado de similitud. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de replicación (verde), módulo accesorio (morado), *bla*_{OXA-72} (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los números de acceso de los primeros 3 plásmidos son: CP023021, CP023027, y CP023035 respectivamente. Los 2 últimos plásmidos corresponden a los proporcionados por el hospital para el niño poblano y el hospital regional ISSSTE Puebla respectivamente.

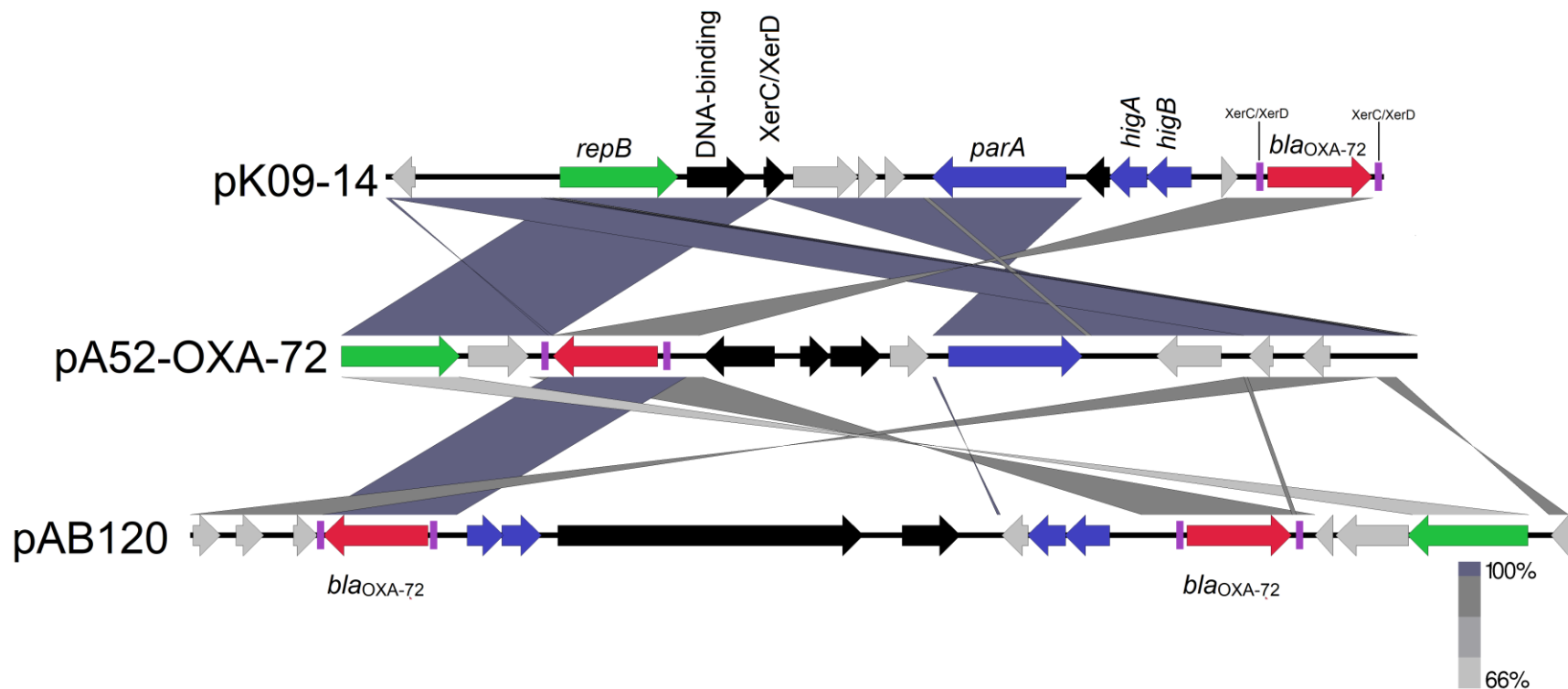


Figura 9B. Alineamientos múltiples de plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla_{OXA-72}*. Los cuales se seleccionaron por tener un *backbone* distinto al resto de plásmidos y además presentan un sistema toxina-antitoxina a diferencia del resto. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de estabilidad (azul), módulo de replicación (verde), *bla_{OXA-72}* (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). Los números de acceso de cada plásmido son: CP043954, CP034097, y CP031446 respectivamente.

8.2.4 Análisis bioinformático de plásmidos portadores de *bla_{IMP}*

Al realizar la búsqueda de plásmidos portadores de *bla_{IMP}* en *A. baumannii* sólo pudo hallarse un plásmido completo que presentaba una variante de esta carbapenemasa (*bla_{IMP-4}*), las características del plásmido se muestran en la **tabla 11**.

Se trató de un plásmido cuyo tamaño es de 327 kb, de una cepa australiana de origen no documentado. Además de *bla_{IMP-4}* el plásmido presentó una gran cantidad de genes de resistencia a antibióticos como macrólidos, aminoglucósidos, oxacilinas, carbenicilina, sulfonamidas, entre otros.

Tabla 11. Información del plásmido portador de *bla_{IMP}* de *A. baumannii* obtenidos de Genbank.

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Tamaño plásmido (pb)	Contenido %G+C	País	Origen de la muestra	CDS	CDS con función predicha
pE47_001 (CP042557)	327,867	41	Australia	Sin información	325	170

%G+C. Porcentaje de guanina y citosina. CDS. Coding sequences

El contenido G+C del plásmido fue del 41%, con un tamaño de 327,867 pb, se trataba de un plásmido no movilizable debido a que no se pudo determinar el *oriT* o alguna relaxasa. Cuenta con varios sistemas toxina-antitoxina, y no se le detectó replicasa.

Tabla 12. Módulos del plásmido de *A. baumannii* portador de *bla*_{IMP-4}

Nombre del plásmido (número de acceso Genbank)	Acceso Genbank	Tamaño plásmido (pb)	Módulo de Replicación	Módulo de Estabilidad	Módulo de Movilización	Módulo Accesorio
pE47_001 (CP042557)	CP042557	327,867	<i>parB/repB</i>	<i>brnA, relE/parE, parA, parB/repB.</i>	<i>virB2, dotL.</i>	<i>bla</i> _{IMP-4} , <i>bla</i> _{OXA-58} , <i>mph€</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>cmlA</i> , <i>sul1</i> , <i>1acE</i> , <i>catB3</i> , <i>aac(6')-Ib4</i> , <i>dfrA19</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{CARB-2} , <i>aph(3')-I</i> , 2 integrones clase 1

En cuanto al entorno genético de *bla*_{IMP}, esta carbapenemasa se encontró insertada dentro de un integrón clase 1 (Figura 10)

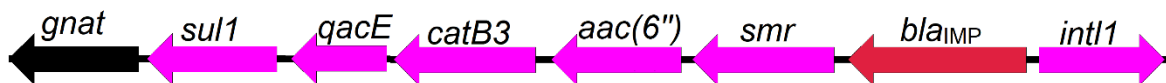
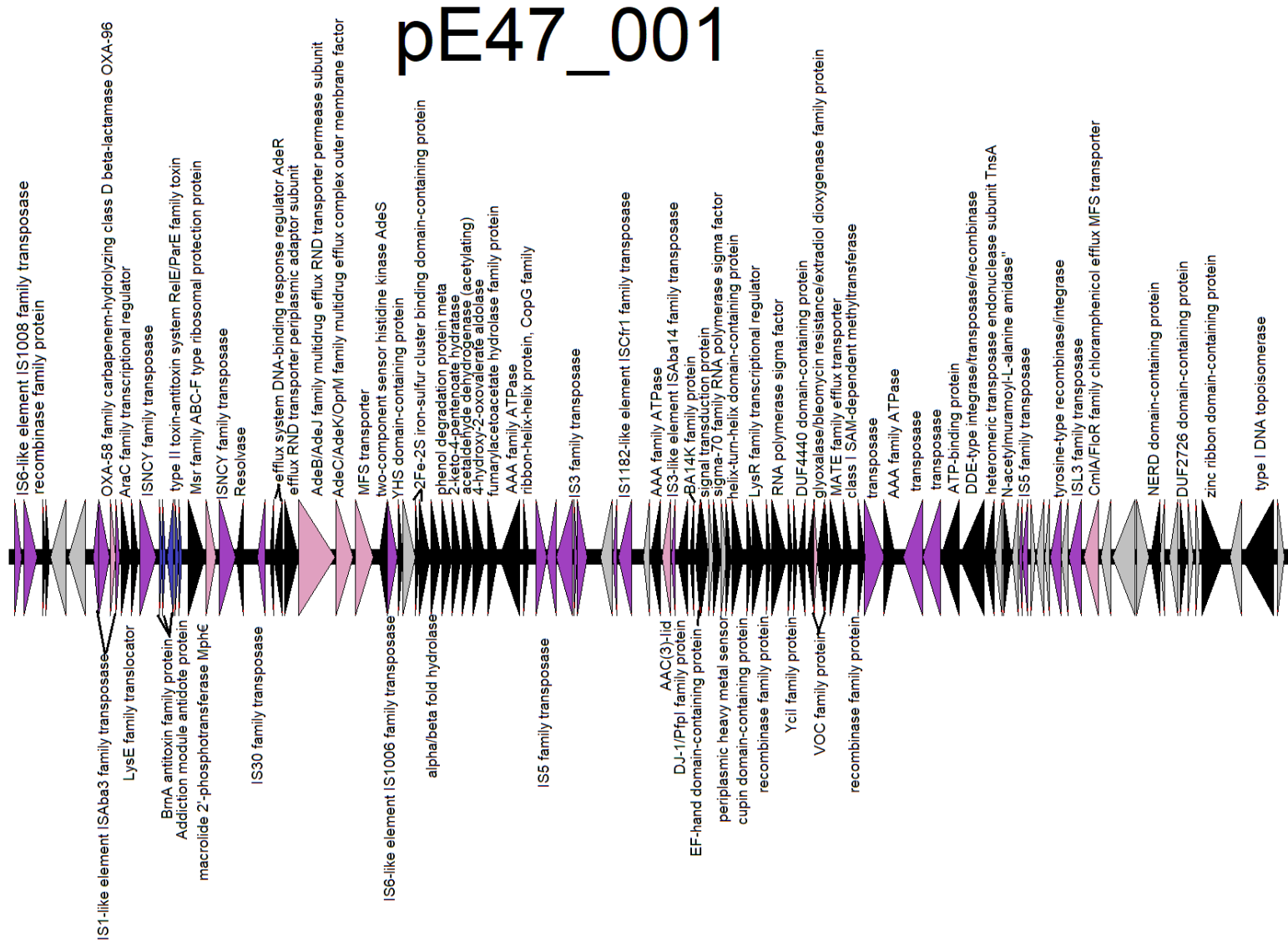


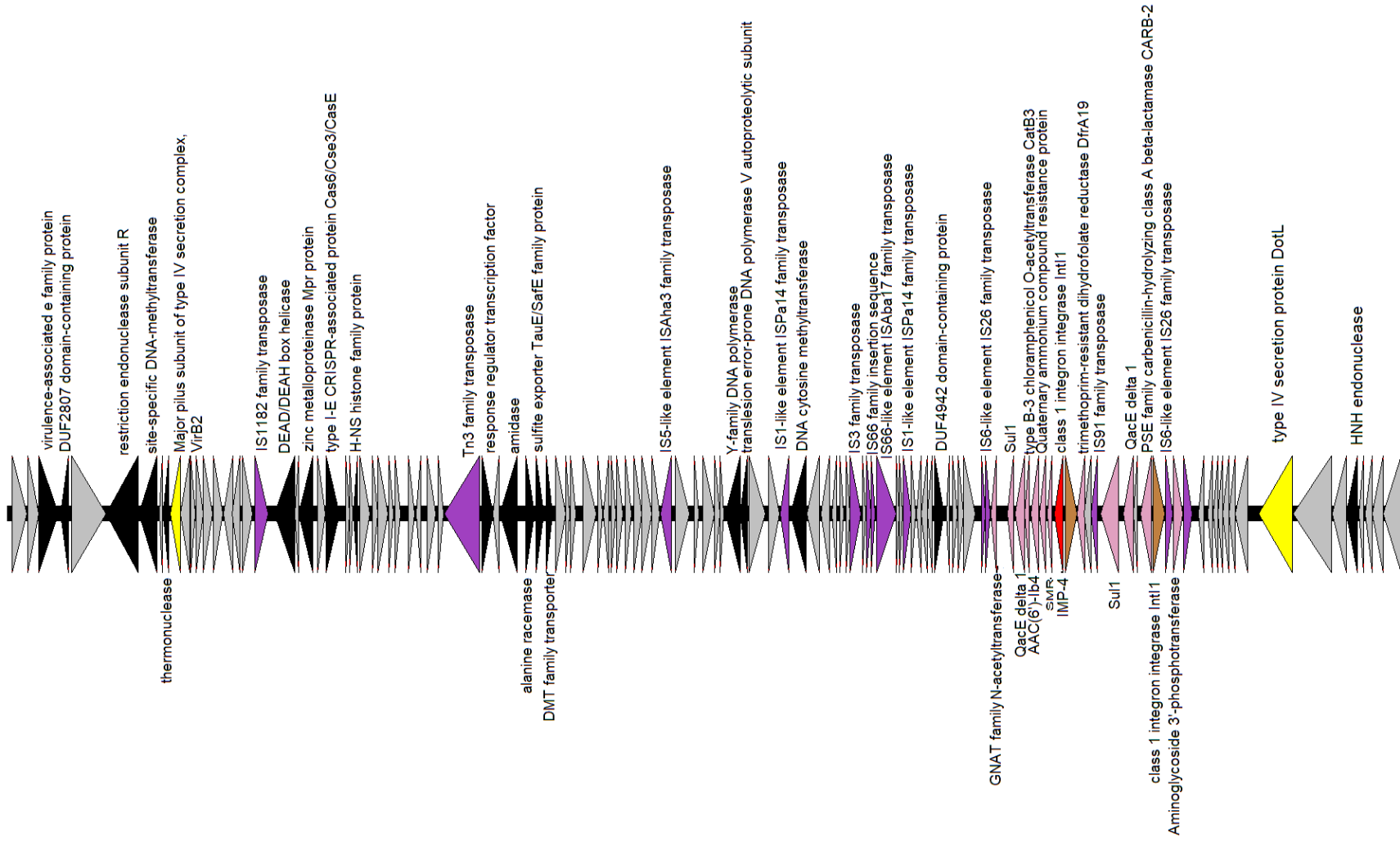
Figura 10. Integrón clase 1 acarreando *bla*_{IMP-4}. Los colores corresponden a: negro: proteína con función; morado: módulo accesorio; rojo: *bla*_{IMP}. GNAT, G+Cn5-related N-acetyltransferases; *sul1*, gen de resistencia a la sulfonamida, *qacE*, gen de resistencia a amonios cuaternarios; *catB3*, cloranfenicol acetiltransferasa; *aac(6'')*-*Ib4*, aminoglucósido acetiltransferasa; *smr*, small multidrug resistance; *intl1*, integrasa.

Debido a la escasez de plásmidos portadores de *bla*_{IMP} en la base de datos del Genbank, sólo se pudo obtener uno completo, por lo cual no fue posible realizar alineamientos con otros plásmidos portadores de *bla*_{IMP}. En la **Figura 11** se observa el plásmido portador de *bla*_{IMP-4}, el cual posee una alta cantidad de genes de

resistencia en el módulo accesorio junto con 2 integrones, uno de ellos con *bla*_{IMP-4} (**Figura 10**), también cuenta con sistemas toxina-antitoxina y de partición en su módulo de estabilidad, sólo cuenta con una proteína del sistema de secreción tipo IV y una proteína acopladora tipo IV.



pE47_001



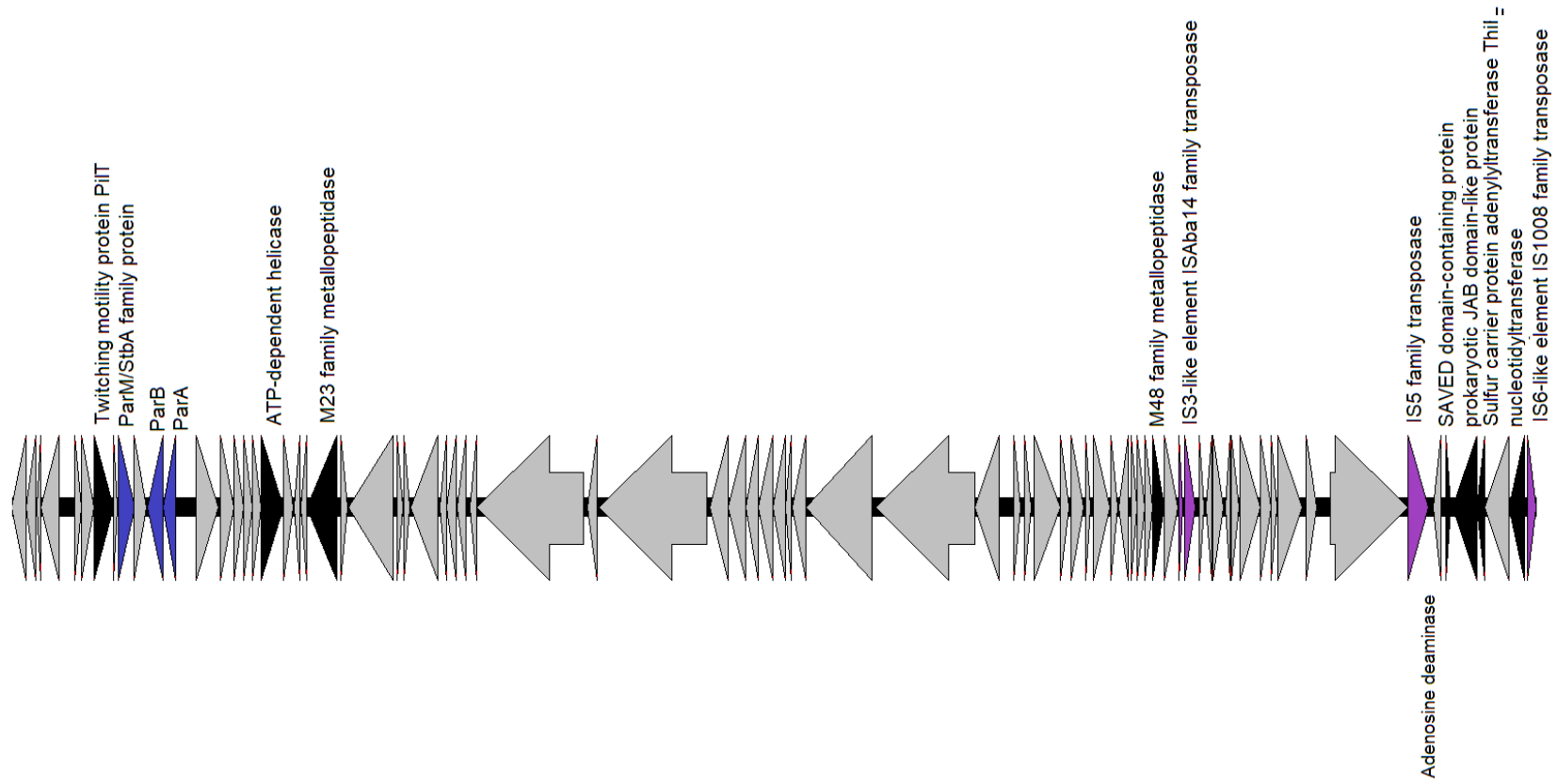


Figura 11. Plásmido de *Acinetobacter baumannii* portador de *bla_{IMP-4}*. Debido a su tamaño, el plásmido fue dividido en 3 partes. Los colores representan a cada módulo de los plásmidos como: módulo de movilización (amarillo), módulo de estabilidad (azul), módulo de replicación (verde), módulo accesorio (morado y rosa), *bla_{IMP-4}* (rojo), proteínas con función determinada (negro) y proteínas hipotéticas (gris). El número de acceso del plásmido es CP042557.

8.2.5 Clasificación de los plásmidos de *A. baumannii* portadores de *bla*_{OXA23}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-72}, y *bla*_{IMP-4} mediante sus replicasas y relaxasas.

Se hizo un análisis de las replicasas como método de clasificación de los plásmidos y así conocer si los plásmidos que portaban una misma carbapenemasas pertenecían a la misma familia de plásmidos con respecto a la replicasa y relaxasas. Se usaron como referencia las replicasas de plásmidos de *A. baumannii* empleadas por Salgado *et al.*, 2020, para determinar grupos de homología de replicasas.

En la **Figura 12** se aprecia un dendrograma que muestra los grupos de homología en los que se encuentran los plásmidos de acuerdo con la replicasa presente en ellos, se puede observar que los plásmidos portadores de las tres carbapenemasas se diferenciaron en 6 grupos de homología, 13 de ellos pertenecieron al grupo GR6 y uno al GR25, los dos plásmidos portadores de *bla*_{NDM} con replicasa presente pertenecieron al GR3, de 8 plásmidos con *bla*_{OXA-72} 5 de ellos pertenecieron a GR29, 2 de ellos a GR26, y uno de ellos a GR2.

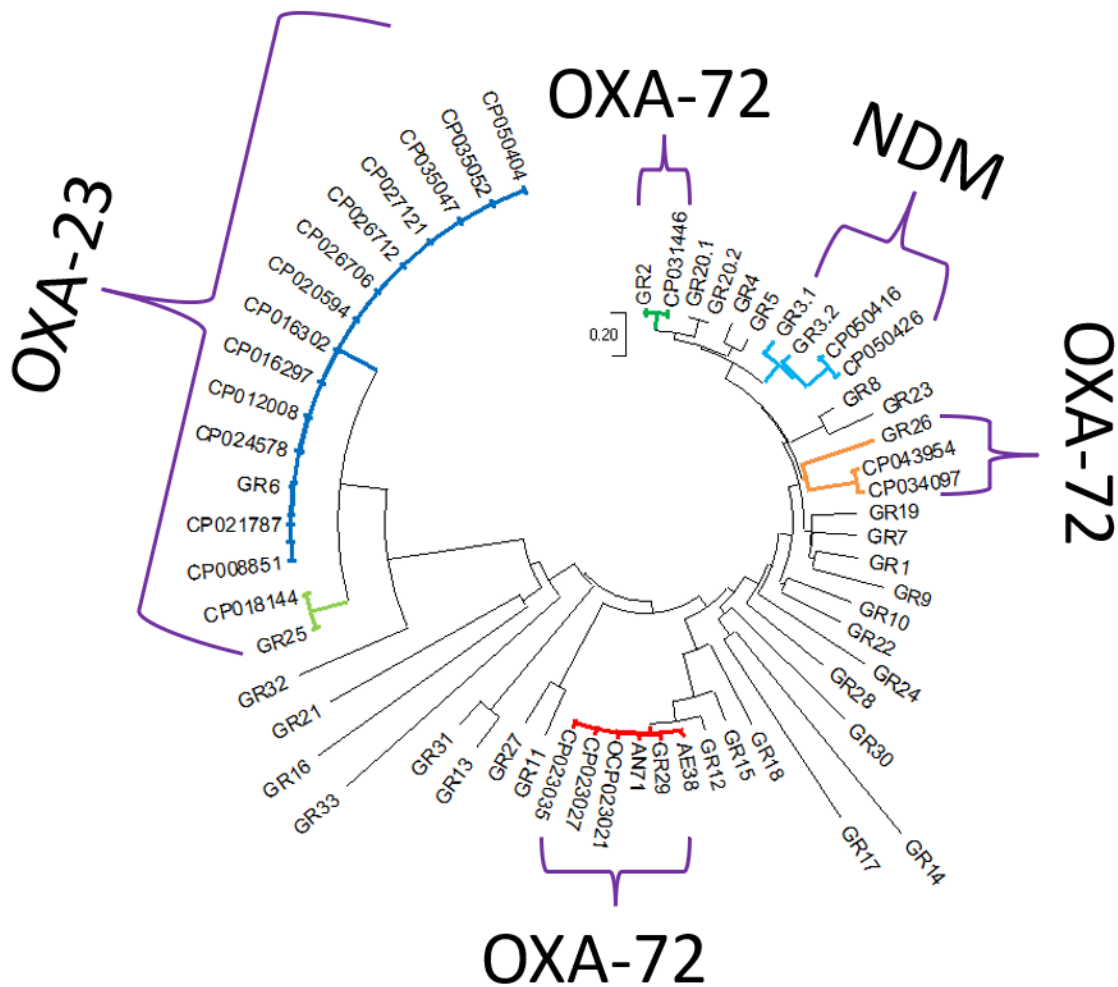


Figura 12. Dendrograma de plásmidos de *A. baumannii* mediante las replicasas *repB*. El dendrograma fue realizado mediante MEGA11

En cuanto a estos resultados, se compararon nuevamente los grupos de plásmidos usando su relaxasa, encontrando que en los plásmidos con *bla*_{OXA-23} de los 13 plásmidos del GR6 solo a 7 de ellos se les detectó la relaxasa MOB_F y el plásmido del GR25 también presentó MOB_F, adicionalmente, los dos plásmidos más pequeños de 8 kb carentes de replicasa presentaron la relaxasa MOB_Q. En los plásmidos con *bla*_{NDM-1} no se pudo ver relación entre replicasas y relaxasas. Los 5 plásmidos con *bla*_{OXA-72} pertenecientes al GR29 presentaron la relaxasa MOB_Q, determinando así una posible relación entre plásmidos de tamaños entre 7 y 11 kb y la relaxasa MOB_Q. A los plásmidos de *bla*_{OXA-72} restantes pertenecientes a GR2 y

GR26 no se les detectó relaxasa. En cuanto al plásmido con *bla_{IMP}* no se pudo realizar este análisis debido a que no se detectaron dichas proteínas.

9 DISCUSIÓN

El incremento en la resistencia a antimicrobianos está a punto de convertirse en una crisis mundial, el conocimiento sobre los mejores tratamientos debe basarse en revisiones de literatura y conocimiento local sobre la resistencia y sus mecanismos de transferencia, bajo criterios rigurosos y constantemente se debe actualizar. *Acinetobacter baumannii* se encuentra asociado a una alta mortalidad en pacientes internados en unidades de cuidados intensivos debido a su extraordinaria capacidad de sobrevivir a la desecación y a la presencia de resistencia a los antibióticos, dando como resultado baja efectividad en los tratamientos (Tamma *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2022).

Actualmente existe un aumento en la incidencia de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, a causa de una diseminación de estas cepas intra e inter-hospitalaria, así como la aparición de cepas resistentes a colistina en unidades de cuidados intensivos. El control de la transmisión de cepas tanto MDR como XDR es una de las prioridades principales en los hospitales ya que los tratamientos se vuelven muy limitados, por lo que se requiere ampliar la información y los datos acerca del control de estas cepas. La limpieza del entorno es una estrategia adecuada para controlar las infecciones asociadas al cuidado de la salud, principalmente en las UCI donde se encuentran pacientes comprometidos (Liu *et al.*, 2020)

En el Laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad, se inició el análisis de cepas de *A. baumannii* portadoras de carbapenemasa provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla para determinar sus mecanismos de resistencia (Verdugo-Yocupicio, 2020), Por lo que en esta tesis se decidió darle continuidad a dicho estudio realizando la búsqueda de genes de resistencia a carbapenémicos en las cepas donde este genotipo fue reportado. Para esto se analizaron 9 cepas mediante PCR para *bla_{NDM}*, donde se mostró que todas las cepas presentaron una banda, pero esta no pudo ser purificada y mandada a secuenciar, por lo que es necesario repetir este experimento con diferentes condiciones en futuros trabajos.

Entre las 24 cepas analizadas portadoras de carbapenemasa, 3 de ellas eran portadoras de *bla*_{OXA-23} según su genotipo de resistencia, por lo que se decidió amplificar dicho gen en las cepas AE14 y AE19 y mandarlo a secuenciar. Luego de analizar las secuencias, se observó que la variante de *bla*_{OXA-23} a la que corresponde en ambas cepas fue *bla*_{OXA-239}, lo cual coincide con investigaciones previas donde se señala que se trata de una variante que sólo ha sido descrita en México (Graña-Miraglia *et al.*, 2020; Tamayo-Legorreta *et al.*, 2014). La cepa AE19 también fue portadora de *bla*_{IMP}, la cual al ser secuenciada y analizada correspondió a la variante de *bla*_{IMP-5}, esta variante fue descrita por primera vez en Portugal, la cual se encontró insertada en un casete genético dentro de un integrón clase 1 llamado In76 (Da Silva *et al.*, 2002).

Por otro lado, a las cepas se les realizó previamente la extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Kieser, 1984). En el presente trabajo a las mismas cepas se realizó una electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE-S1) para conocer el perfil y peso molecular de los plásmidos. Al observar los resultados, se pudo apreciar que sólo 4 cepas de las 23 cepas presentaron 1 banda plasmídica donde el tamaño aproximado de 3 de ellas (AE41, AE44 y AE45) fue de 192 kb y la restante (AE23) es de 205 kb, lo cual respecto al número de plásmidos coincide parcialmente con lo reportado por (Verdugo-Yocupicio, 2020), y en cuanto a la cepa AE44 no se obtuvo una buena extracción en el trabajo previo, pero en el presente trabajo con la PFGE se logra observar una banda de 192 kb aprox. Respecto a la cepa AE45, se habían reportado en ella dos bandas plasmídicas, pero solamente se encontró una, esto puede deberse a que las técnicas empleadas para determinar el perfil plasmídico fueron distintas, lo cual se sugiere que podría tratarse de las bandas o isoformas que pueden aparecer al correr el plásmido cerrado (Kieser, 1984). En cuanto al resto de cepas no se apreciaron bandas plasmídicas, a diferencia de lo reportado anteriormente donde a la mayoría de las cepas se les había reportado por lo menos una banda. Esto indica que las cepas pudieron haber perdido los plásmidos con el tiempo, aunque también se debe repetir el ensayo con otro lote de cepas guardadas y estandarizar la técnica para estas cepas.

Como se ha reportado además de la resistencia mediada por enzimas modificadoras de antibióticos, otro mecanismo de resistencia son las bombas de eflujo, las cuales son responsables de la resistencia en *A. baumannii*. Las bombas de eflujo se encuentran más ampliamente distribuidas y tienen un perfil de sustrato más amplio, lo que le da resistencia a una mayor variedad de drogas. Las bombas constan de tres partes: una proteína de fusión de membrana (AdeA), el multidrogo-transportador (AdeB) y una proteína de membrana externa (AdeC). El sistema AdeABC, es uno de los más predominantes, el cual pertenece a la superfamilia RND, estas superfamilias se agrupan de acuerdo con la homología en la secuencia de aminoácidos. La superfamilia RND de bombas de eflujo incluye a las bombas AdeABC, AdeDE, AdeFGH, AdeIJK y AdeXYZ, que son las más estudiadas en *A. baumannii* (Xu *et al.*, 2019).

Nuestros resultados mostraron que solamente las cepas AE14 y AE16 presentaron una disminución del valor de la CMI a IMP de 4 y 16 veces respectivamente en presencia del inhibidor CCCP, lo cual podría indicar una expresión activa de bombas como mecanismo de resistencia (Sánchez-Carbonel *et al.*, 2021). En cuanto a las otras seis se observó una disminución en 2 veces el valor de la CMI (AE19, AE30A, AE30B, AE44, AE50 y AE51) pero esto no se puede considerar como fenotipo positivo para bombas de expulsión (Sánchez-Carbonel *et al.*, 2021) de acuerdo con la definición de la participación de la bomba. Además la concentración usada del inhibidor fue menor a la usada en otros estudios, por lo que se sugiere se realice con diferentes concentraciones del inhibidor para corroborar este comportamiento, por lo tanto podría considerarse que existen otros mecanismos además de las bombas que sean los que le confieren la resistencia a estas cepas, como son la producción de beta-lactamasas tipo OXA y metalo-betalactamasas, que de acuerdo a lo que se observó en el genotipo de resistencia también pueden contribuir en supervivencia de las cepas. Finalmente, en cuanto a las cepas en presencia de ciprofloxacina, únicamente la cepa AE34 mostró una disminución en 4 veces el valor de la CMI, el resto mostró una disminución en 2 el valor de la CMI, por lo que puede

tratarse de otros mecanismos de resistencia a ciprofloxacino (Verdugo-Yocupicio, 2020).

Así mismo, se realizó un análisis bioinformático de plásmidos portadores de carbapenemasas descargados del Genbank, los cuales estaban completos y cerrados, para así poder conocer las características del *backbone* de plásmidos portadores de carbapenemasas y poderlos comparar con los plásmidos de cepas poblanas. Los plásmidos de *A. baumannii* cuentan con un *backbone* que corresponde a los módulos de replicación, estabilidad y transferencia, este *backbone* generalmente está acompañado por un módulo accesorio que provee funciones adaptativas de acuerdo con el contexto selectivo (Brovedan *et al.*, 2019). Los módulos de replicación (Rep) y movilización (MOB) son empleados para la clasificación de plásmidos (Lean y Yeo, 2017).

En el presente trabajo, en la parte bioinformática, se analizaron 37 plásmidos de *A. baumannii* portadores de carbapenemasas de los cuales 35 fueron descargados del Genbank, un plásmido proviene de una cepa aislada en el Hospital para el Niño Poblano (AN71) y otro proviene de una cepa del Hospital Regional ISSSTE Puebla (AE38). 18 de los plásmidos son portadores de *bla*_{OXA-23}, 10 plásmidos portan *bla*_{NDM-1}, 6 plásmidos portan *bla*_{OXA-72} al igual que los 2 plásmidos provenientes de las cepas hospitalarias de Puebla, y un plásmido portador de *bla*_{IMP}.

Al realizar el análisis de los 18 plásmidos portadores de *bla*_{OXA-23}, en 13 de ellos se determinó un contenido de G+C del 34% y un tamaño entre los 70 y 100 kb, ya que los dos más pequeños contenían un 38% de G+C y su tamaño es de 8,215 pb.

De acuerdo con el análisis de los módulos, los plásmidos portadores de *bla*_{OXA-23}, respecto del módulo de movilización se destaca que la mayoría de los plásmidos pudieran ser conjugativos, ya que cuentan con la maquinaria completa para su transferencia a otras bacterias vía conjugación. A excepción de los dos plásmidos más pequeños de 8,215 pb y los 2 plásmidos más grandes, cuyo tamaño es de 127,784 pb y 215,278 pb, los cuales podrían considerarse como no movilizables ya que no se detectó *relaxasa* ni *OriT* de acuerdo con los criterios de Smillie *et al.*, 2010. Esto probablemente por su gran tamaño, ya que implica un mayor gasto

respecto a coste y segregación (Gama *et al.*, 2018). En el análisis de los dos plásmidos más pequeños no se detectó replicasa, en cambio se encontraron sistemas toxina-antitoxina, indicando la persistencia de estos plásmidos en las células portadoras (Fernández-García *et al.*, 2018). Por otro lado es importante señalar que *bla*_{OXA-23} se encontró insertada en el transposón compuesto *Tn2007*, lo cual sugiere que este transposón se encuentra en plásmidos pequeños como se ha reportado previamente (Mindlin *et al.*, 2020), en cambio, *Tn2006* se observó en 3 plásmidos de mayor tamaño que van desde las 86 hasta 98 kb, esto concuerda con lo descrito por (Mosqueda *et al.*, 2013) donde observó que *Tn2006* se movilizaba en un plásmido de 90 kb. Finalmente el transposón *Tn2008* se observó en 12 de los plásmidos de la colección, cuyo tamaño va desde las 72 hasta las 215 kb.

En cuanto a las replicasas de los plásmidos con *bla*_{OXA-23}, se determinó que todos los plásmidos con replicasa detectada a excepción de una pertenecen al GR6, indicando así que *bla*_{OXA-23} se moviliza principalmente en plásmidos con esta replicasa dentro de *A. baumannii*, además estos plásmidos compartieron el mismo *backbone*, con un tamaño de entre 70 y 100 kb, un contenido de G+C del 34%, un sistema de secreción tipo IV completo, la proteína acopladora tipo IV, las toxinas zeta, HigB o ambas, y la relaxasa MOB_F entre los plásmidos en los que pudo detectarse relaxasa. Además, en dos plásmidos más pequeños se determinó la presencia de MOB_Q, la cual según lo descrito por Mindlin *et al.*, 2020 se encuentra en los plásmidos pequeños y de tamaño mediano (de 2 a 12 y de 12 a 40 Kb respectivamente, como lo observamos en estos plásmidos estudiados.

En el módulo accesorio de estos plásmidos se pudieron ver algunas enzimas modificadoras de aminoglucósidos, pero no se observó prevalencia de alguna de éstas. Adicionalmente, se detectaron las secuencias de inserción IS_{Aba1} e IS_{Aba4} río arriba del gen *bla*_{OXA-23} formando un transposón, el cual se ha reportado que incrementa la expresión de las carbapenemasas (Koirala *et al.*, 2020).

La presencia de múltiples genes de resistencia dentro de plásmidos conjugativos, donde también se encuentra una carbapenemasa, indica que estos plásmidos cuentan con una amplia plasticidad genómica, esto siendo promovido por una

variedad de elementos genéticos móviles con múltiples islas de resistencia, los cuales se pueden insertar dentro de estos plásmidos, que junto a los genes de resistencia genómicos pueden permitirle a la cepa ser resistente a casi cualquier antibiótico que se pudiera emplear, convirtiéndose en un grave problema de salud a nivel global (Lean y Yeo, 2017).

Los plásmidos donde se moviliza *bla*_{N_{DM}} cuya variante determinada en todos fue *bla*_{N_{DM}-1}, presentaron tamaños desde 39 kb hasta 264 kb, su contenido de G+C está entre 37% y 44%. Respecto al análisis *in silico* de los módulos del *backbone*, en el módulo de movilización de los plásmidos sólo se pudo determinar una relaxasa en los de menor tamaño, los 5 plásmidos de mayor tamaño carecían de esta. En cuanto al sistema de secreción tipo IV, los 5 plásmidos más pequeños (39 - 64 kb) cuentan con el sistema completo, mientras que los 5 plásmidos más grandes (100 – 264 kb) tienen este sistema incompleto ya que algunas proteínas están ausentes o al menos no fueron detectadas mediante el análisis bioinformático. Suele ser frecuente en algunos géneros bacterianos que tienen *bla*_{N_{DM}-1} en su genoma, que *ISAba125* puede aparecer como una quimera con este gen como se ha observado con *Acinetobacter lwoffii*, o bien que haya un fragmento de *ISAba125* río abajo de *bla*_{N_{DM}-1}, siendo esto el posible resultado de una recombinación entre copias de secuencias repetidas cortas como se ha visto en *A. baumannii*. En todos los casos *bla*_{N_{DM}-1} siempre se encuentra río debajo de un elemento *ISAba125* intacto o truncado (Partridge e Iredell, 2012). Para el módulo de estabilidad en 7 de los plásmidos, se encontró al menos una proteína del sistema toxina antitoxina donde en 3 de los 4 plásmidos de menor tamaño se observa la toxina zeta, la cual pertenece al sistema TA tipo II, siendo este sistema TA el más recurrente en *A. baumannii* (Rocker *et al.*, 2018; Brovedan *et al.*, 2020). Los 4 plásmidos de menor tamaño (39 – 48 kb) compartieron la relaxasa *MOB_Q*, esto mismo se observó en otros estudios en un plásmido de una cepa de *A. bereziniae*, el cual tenía un tamaño de 44 kb y es portador de *bla*_{N_{DM}} (Brovedan *et al.*, 2019). En 2 de los 5 plásmidos de mayor tamaño se observa que presentan la misma estructura, portando la toxina *AbiEii/AbiGii* que también es parte del sistema TA tipo II, y se encontró el sistema *ParAB*. Estos 2 plásmidos pertenecieron al GR3 de replicasas, cuya estructura ya

fue reportada previamente en diversos plásmidos por Salgado *et al.*, 2020, indicando la alta prevalencia de plásmidos con estas características y la presencia de genes conservados.

En cuanto al entorno genético de *bla*_{N_{DM}}, como se ha observado en diferentes estudios (Márquez-Ortiz *et al.*, 2017) se determinó su presencia dentro del transposón *Tn*125 en todos los plásmidos a excepción de 3 que de acuerdo con el análisis *in silico* probablemente tengan el transposón truncado como usualmente se observa en estos elementos (Wailan *et al.*, 2015), ya que no se encontró la secuencia de inserción *ISAba*125 en uno de los extremos que forman a este transposón.

Al realizar el análisis de las replicasas en plásmidos portadores de *bla*_{N_{DM}}, sólo se pudieron detectar en dos plásmidos prácticamente idénticos, al alinearla estas replicasas con los grupos de replicasas presentes en *A. baumannii*, se pudieron clasificar como GR3, pero en el resto de los plásmidos no se pudo detectar alguna replicasa, por lo que para estos plásmidos no se puede realizar este método de clasificación. En cuanto a la clasificación por MOB, en los 4 plásmidos más pequeños (pN_{DM}-0285, unnamed2 (CP027532), p6200-47.274kb y pAbN_{DM}-1), la relaxasa presente pertenecía a MOB_Q, la cual es la relaxasa más prevalente en *Acinetobacter* spp. (Salto *et al.*, 2018) posteriormente, al plásmido que les sigue en tamaño (unnamed2 (CP053220)) se le detectó la relaxasa MOB_P, y a los plásmidos de mayor tamaño (>100 kb) no se les detectó relaxasa, esto concuerda con los estudios sobre el análisis de cepas de *Acinetobacter lwoffii* aisladas del permafrost o hielo perpetuo del noreste de Rusia, donde en 3 de los 4 plásmidos grandes (>40 kb) no se les pudo determinar la familia MOB (Mindlin *et al.*, 2020). Esta diversidad que existe entre los plásmidos portadores de *bla*_{N_{DM}-1} se debe a su gran diseminación entre distintas especies bacterianas. Inicialmente fue descrita en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, después fue encontrada en la mayoría de las especies de enterobacterias y otras especies como *A. baumannii*, habiendo reportes de *A. baumannii* portando esta betalactamasa en varios países del mundo (Poirel *et al.*, 2012).

Al realizar el análisis de plásmidos portadores de *bla*_{OXA-72}, se pudo determinar que esta carbapenemasa se moviliza en plásmidos pequeños con tamaños de 7Kb a 10Kb, esto concuerda con el trabajo realizado por (Jia *et al.*, 2019), el cual dice que *bla*_{OXA-72} se moviliza en plásmidos pequeños con un tamaño que va de 8 a 12 kb.

Interesantemente, los plásmidos de aislados de México presentaron la misma estructura únicamente con cambios en las orientaciones de sus genes, estudios han demostrado que la ocurrencia de estos genes se encuentra en todo el mundo y siempre se encuentra flanqueada por sitios de recombinación XerC/XerD que pueden ser los responsables de la movilización de los genes *bla*_{OXA-24/40-like} (como *bla*_{OXA-72}), entre las especies de *Acinetobacter* (Tamayo-Legorreta *et al.*, 2016).

Los módulos de los plásmidos constaban de pocos genes, lo que deriva a que los plásmidos fueran pequeños, sólo se pudieron clasificar 5 de los plásmidos como movilizables debido a la presencia de la relaxasa, (Smillie *et al.*, 2010), los 3 plásmidos restantes, en cambio, presentaron sistemas toxina-antitoxina la cual es una estrategia para favorecer la competitividad de los plásmidos en la progenie de la célula en ausencia de presión selectiva, principalmente en plásmidos portadores del gen *bla*_{OXA24/bla}_{OXA40-like} (Fernández-García *et al.*, 2016).

Respecto a las replicasas, se determinó que los plásmidos de las 5 cepas provenientes de México pertenecían al grupo GR29, para las 3 cepas restantes, 2 de ellas pertenecieron al GR2 de las cuales una fue aislada de suelo y la otra de músculo. La replicasa restante proveniente de un plásmido de una cepa aislada de expectoración no pudo clasificarse por esta técnica, ya que al ser una *repM* no entra dentro de esta clasificación (Bertini *et al.*, 2010; Salgado-Camargo *et al.*, 2020). Las relaxasas también se compartieron en los 5 plásmidos pequeños, siendo MOB_Q la que se halló presente en estos, correspondiendo con lo determinado por Mindlin *et al.*, en 2020, que indica que esta relaxasa se encuentra en plásmidos pequeños y de tamaño mediano (de 2 a 12 y de 12 a 40 Kb respectivamente). En los 3 restantes no se pudo determinar la presencia de relaxasa.

En la base de datos del Genbank, solamente se pudo encontrar un plásmido completo portador de *bla*_{IMP}, por lo que no se pudieron realizar alineamientos con

otros plásmidos, esto puede ser debido a que es poco frecuente la presencia de las metalo-betalactamasas comparado con las beta-lactamasas de tipo *bla_{OXA}* en *Acinetobacter* (Zarrilli *et al.*, 2013).

10 CONCLUSIONES

En cepas *A. baumannii* de Puebla, portadoras de *bla*_{OXA-72}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-239} y *bla*_{IMP-5}, se observaron plásmidos de tamaño 191 y 205. También se determinó la participación de las bombas de expulsión de la familia RND en la resistencia a imipenem y ciprofloxacino en algunas cepas.

Los plásmidos portando *bla*_{OXA-72} (provenientes de México) presentaron *backbones* y GR similares entre ellos, donde se observó la presencia de los mismos genes variando únicamente en las orientaciones de estos. Los plásmidos con *bla*_{OXA-23} también fueron similares, presentando tamaños parecidos y genes característicos de los módulos de movilización y replicación idénticos, esto probablemente debido a la alta prevalencia de *bla*_{OXA} presentes en *A. baumannii*. Sin embargo, en plásmidos con *bla*_{NDM} se observó una alta variación en su *backbone*, probablemente a que *bla*_{NDM} es movilizadora no solo por plásmidos, sino también por elementos IS y transposones en otros de géneros bacterianos. Esto nos permite ver la importancia de conocer características de los plásmidos para entender su movilización y su participación en la diseminación de la resistencia a antibióticos.

11 PERSPECTIVAS

- Continuar la caracterización de los plásmidos de las cepas de Puebla de *A. baumannii* MDR con base a su replicasa y relaxasa.
- Elaborar esquemas de clasificación adicionales para plásmidos carentes de replicasa y relaxasa
- Realizar ensayos de conjugación para conocer la capacidad de transferencia de los plásmidos entre el mismo y diferente género bacteriano.
- Continuar con los monitoreos epidemiológicos y moleculares en los hospitales de Puebla para vigilar el surgimiento de especies de *Acinetobacter* spp. resistentes a antibióticos.

12 BIBLIOGRAFÍA

A.C. Narciso, W.M.B.S. Martins, L.G.P. Almeida, et al., Healthcare-associated carbapenem-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* of the clonal complex CC79 colonizing migratory and captive aquatic birds in a Brazilian Zoo, *Science of the Total Environment* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138232>

Akrami, F., & Namvar, A. E. (2019). *Acinetobacter baumannii* as nosocomial pathogenic bacteria. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 34(2), 84-96.

Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M. L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of non-baumannii *Acinetobacter* species. *Frontiers in microbiology*, 7, 49.

Bartal, C., Rolston, K. V., & Neshler, L. (2022). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: colonization, infection and current treatment options. *Infectious Diseases and Therapy*, 1-12.

Bello-López, E., Castro-Jaimes, S., Cevallos, M. A., Rocha-Gracia, R. D. C., Castaneda-Lucio, M., Sáenz, Y., Gutiérrez-Cazares, Z., Martínez-Laguna, Y., & Lozano-Zarain, P. (2019). Resistome and a novel bla NDM-1-harboring plasmid of an *Acinetobacter haemolyticus* strain from a children's hospital in Puebla, Mexico. *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., Saenz, Y., Torres, Y., Gutiérrez-Cázares, Z., Arenas-Hernández, M. & Lozano-Zarain, P. (2020). Antibiotic resistance mechanisms in *Acinetobacter* spp. strains isolated from patients in a paediatric hospital in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 120-129.

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.

Bottery, M. J., Pitchford, J. W., & Friman, V. P. (2021). Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. *The ISME Journal*, 15(4), 939-948.

Brisou J, Prevot A. Etudes de systématique bactérienne. X. Révision des especes réunies dans le genre *Achromobacter*. *Annales de l'Institut Pasteur*.1954;86(6):722 - 728.

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.

Castro-Jaimes, S., Guerrero, G., Bello-López, E., & Cevallos, M. A. (2022). Replication initiator proteins of *Acinetobacter baumannii* plasmids: An update note. *Plasmid*, 119, 102616.

Chatterjee, S., Mondal, A., Mitra, S., & Basu, S. (2017). *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2201-2207.

Cornejo-Juárez P, Cevallos MA, Castro-Jaimes S, Castillo-Ramírez S, Velázquez-Acosta C, Martínez-Oliva D, et al. (2020) High mortality in an outbreak of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infection introduced to an oncological hospital by a patient transferred from a general hospital. PLoS ONE 15(7): e0234684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234684>

Da Silva, G.J.; Correia, M.; Vital, C.; Ribeiro, G.; Sousa, J.C.; Leitao, R.; Peixe, L.; Duarte, A. Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, 215, 33–39.

De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. 2020. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev* 33:e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.

Doi, Y., Murray, G. L., and Peleg, A. Y. (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 36, 85–98. doi: 10.1055/s-0034-1398388

Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T., et al. (2016). Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins (Basel)*. 8:227. doi: 10.3390/toxins8070227

Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., & de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS microbiology reviews*, 28(1), 79-100.

Gama, J. A., Zilhão, R., & Dionisio, F. (2018). Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance. *Plasmid*, 99, 82-88.

Gontijo, A. V. L., Pereira, S. L., & de Lacerda Bonfante, H. (2021). Can Drug Repurposing be Effective Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*?. *Current Microbiology*, 79(1), 1-12.

Graña-Miraglia L, Evans BA, López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Volkow-Fernández P, Cevallos MA, Franco-Cendejas R, Castillo-Ramírez S.

2020. Origin of OXA-23 variant OXA-239 from a recently emerged lineage of *Acinetobacter baumannii* international clone V. *mSphere* 5:e00801-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00801-19>.

Hamidian M, Kenyon JJ, Holt KE, Pickard D, Hall RM. 2014. A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene *bla*_{OXA-23} in AbaR4 in an extensively resistant G+C1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J Antimicrob Chemother* 69:2625–2628.

Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. 2018. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* 16: 91–102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>.

Hendrickx, A. P., Schade, R. P., Landman, F., Bosch, T., Schouls, L. M., & van Dijk, K. (2022). Comparative analysis of IMP-4-and OXA-58-containing plasmids of three carbapenemase-producing *Acinetobacter ursingii* strains in the Netherlands. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.

Jeannot K, Diancourt L, Vaux S, Thouverez M, Ribeiro A, *et al.* (2014) Molecular Epidemiology of Carbapenem Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* in France. *PLoS ONE* 9(12): e115452. doi:10.1371/journal.pone. 0115452

Jia, H.; Sun, Q.; Ruan, Z.; Xie, X. Characterization of a small plasmid carrying the carbapenem resistance gene *bla*_{OXA-72} from community-acquired *Acinetobacter baumannii* sequence type 880 in China. *Infect. Drug Resist.* 2019, 12, 1545–1553.

Kapp, E., Malan, S. F., Joubert, J., & Sampson, S. L. (2018). Small molecule efflux pump inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*: a rational drug design perspective. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(1), 72-86.

Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1), 19-36.

Koirala J, Tyagi I, Guntupalli L, Koirala S, Chapagain U, Quarshie C, *et al.* OXA-23 and OXA-40 producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Illinois. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2020;97: 114999. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.114999>.

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.

Lean, S. S., & Yeo, C. C. (2017). Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: good, bad, who knows?. *Frontiers in microbiology*, 8, 1547.

Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha C-J, Jeong BC and Lee SH (2017) *Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.

Li J, Fu Y, Zhang J, Wang Y, Zhao Y, Fan X *et al.* Efficacy of tigecycline monotherapy versus combination therapy with other antimicrobials against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 2 in Heilongjiang Province. *Ann Palliat Med.* 2019;8(5):651-659.

Liu LL, Ji SJ, Ruan Z, Fu Y, Fu YQ, Wang YF, and Yu YS. 2015. Dissemination of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. in China: main roles of conjugative plasmid pAZJ221 and transposon Tn2009. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1998–2005.

Liu, L, Liu, B, Li, W. Successful incidences of controlling multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and nosocomial infection *Acinetobacter baumannii* using antibiotic stewardship, infection control programs, and environmental cleaning at a Chinese university hospital. *Infect Drug Resist* 2020;13:2557–2570.

Luna BM, Yan J, Reyna Z, Moon E, Nielsen TB, Reza H, *et al.* (2019) Natural history of *Acinetobacter baumannii* infection in mice. *PLoS ONE* 14(7): e0219824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219824>.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Monnet, 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, Ochoa SA, Reyes-Grajeda JP, Flores V, Medina-Contreras O, Espinosa-Mazariego K, Parra-Ortega I, Rosa-Zamboni DDL, Castellanos-Cruz MdC, Arellano-Galindo J, Cevallos MA, Hernández-Castro R, Xicohtencatl-Cortes J and Cruz-Córdova A (2020) Molecular Epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex Isolated From Children at the Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Front. Microbiol.* 11:576673. doi: 10.3389/fmicb.2020.576673

Marquez-Ortiz RA, Haggerty L, Olarte N, Duarte C, Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, Castro BE, Sim EM, Beltran M, Moncada MV, Valderrama A, Castellanos JE, Charles IG, Vanegas N, Escobar-Perez J, Petty NK. 2017. Genomic epidemiology of NDM-1-encoding plasmids in Latin American clinical isolates reveals insights into the evolution of multidrug resistance. *Genome Biol Evol* 9:1725–1741.

Mindlin S, Beletsky A, Rakitin A, Mardanov A and Petrova M (2020) *Acinetobacter* Plasmids: Diversity and Development of Classification Strategies. *Front. Microbiol.* 11:588410. doi: 10.3389/fmicb.2020.588410

Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Alvarez-Lerma F, Montero M, Gomez J, Horcajada JP, Vila J, and Roca I. 2013. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5155–5157.

Novovic K, Mihajlovic S, Vasiljevic Z, Filipic B, Begovic J, Jovicic B (2015) Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Serbia: Revision of CarO Classification. *PLoS ONE* 10(3): e0122793. doi:10.1371/journal.pone.0122793

Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;54(2):61-74. doi: 10.5603/FHC.a2016.0009. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27270503.

Partridge, S. R., & Iredell, J. R. (2012). Genetic contexts of bla NDM-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 6065-6067.

Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 538-582.

Poirel L., Bonnin R. A., Boulanger A., Schrenzel J., Kaase M., Nordmann P. 2012a; Tn125-related acquisition of blaNDM-like genes in *Acinetobacter baumannii* . *Antimicrob Agents Chemother* 56:1087–1089

Rocker, A.; Peschke, M.; Kittila, T.; Sakson, R.; Brieke, C.; Meinhart, A. The ng_ζ1 toxin of the gonococcal ε/ζ toxin/antitoxin system drains precursors for cell wall synthesis. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1686.

Salgado-Camargo AD, Castro-Jaimes S, Gutierrez-Rios R-M, Lozano LF, Altamirano-Pacheco L, Silva-Sanchez J, Pérez-Oseguera Á, Volkow P, Castillo-Ramírez S and Cevallos MA (2020) Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids. *Front. Microbiol.* 11:1283. doi: 10.3389/fmicb.2020.01283.

Salto IP, Tejerizo GT, Wibberg D, Pühler A, Schlüter A, Pistorio M. Comparative genomic analysis of *Acinetobacter* spp. plasmids originating from clinical settings and environmental habitats. *Sci Rep.* 2018;8:7783–7794. doi: 10.1038/s41598-018-26180-3

Sánchez-Carbonel, A., Mondragón, B., López-Chegne, N., Pena-Tuesta, I., Huayan Dávila, G., Blitchtein, D., Carrillo-Ng, H., Silva-Caso, W., Aguilar-Luis, M., Del ValleMendoza, J., 2021. The effect of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 16, e0259915.

Saranathan, R., Sudhakar, P., Karthika, R. U., Singh, S. K., Shashikala, P., Kanungo, R., & Prashanth, K. (2014). Multiple drug resistant carbapenemases producing *Acinetobacter baumannii* isolates harbours multiple R-plasmids. *The Indian Journal of Medical Research*, 140(2), 262.

Singh H, Thangaraj P, Chakrabarti A. *Acinetobacter baumannii*: A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current ISSN 1727- 897X Medisur and Future Therapeutic Management. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(11):2602-2605.

Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434-452.

Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M., & Amaral, L. (2017). New roads leading to old destinations: efflux pumps as targets to reverse multidrug resistance in bacteria. *Molecules*, 22(3), 468.

Tamayo-Legorreta, E., Turrubiarres-Martinez, E., Garza-Ramos, U., Nino-Moreno, P., Barrios, H., Sanchez-Perez, A., et al. (2016). Outbreak caused by blaOXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* ST417 detected in clinical and environmental isolates. *Microb. Drug Res.* 22, 129–133. doi: 10.1089/mdr.2015.0157

Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., van Duin, D., & Clancy, C. J. (2022). Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of AmpC betaLactamase–Producing Enterobacterales, Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 74(12), 2089-2114.

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), 2233-2239.

Verdugo-Yocupicio, R. (2020) Determinación de mecanismos de resistencia a los antibióticos en *Acinetobacter* spp. del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla [Tesis]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R *et al.* In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and cloramfenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37 (1993), pp. 138-141

Vila, J., Martí, S., & Sanchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(6), 1210-1215.

Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Czobor, I. B., & Chifiriuc, M. C. (2020). Antibiotic resistance profiles, molecular mechanisms and innovative treatment strategies of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 8(6), 935.

Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. 2016. Genomic characteristics of NDM-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Australia

and their *bla*NDM genetic contexts. *Antimicrob Agents Chemother* 60:136 –141. doi:10.1128/AAC.01243-15.

Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. 2017. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev* 30:409–447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>.

Xu, C.; Bilya, S.R.; Xu, W. *adeABC* efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes New Infect.* 2019, 30, 100549.

Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., & Tsakris, A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International journal of antimicrobial agents*, 41(1), 11-19.

Zhang, J., Xie, J., Li, H., Wang, Z., Yin, Y., Wang, S., ... & Wang, H. (2022). Genomic and Phenotypic Evolution of Tigecycline-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Critically Ill Patients. *Microbiology spectrum*, 10(1), e01593-21.

Zhao, Y., Hu, K., Zhang, J., Guo, Y., Fan, X., Wang, Y., ... & Zhang, X. (2019). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in ICU of the eastern Heilongjiang Province, China. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1-7.

Actividades realizadas durante la estancia en la maestría

Clases impartidas

Análisis bioinformático de secuencias en apoyo a alumnos de servicio social del LMHyC de agosto del 2021 a junio del 2022.

Congresos

J Jiménez-Villalpando, J Gómez-Martínez, Rosa Rocha-Gracia, E Bello-López, C Martínez de la Peña, P Lozano-Zarain. Análisis bioinformático de plásmidos portadores de las carbapenemasas *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-72} en *Acinetobacter baumannii*. XLVI Congreso Anual de la AMIMC. Centro de Convenciones de San Luis Potosí, SLP. 25 al 28 de mayo 2022.