

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Secuenciación masiva del genoma para el estudio del resistoma y viruloma de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* procedentes de Alejandría, Egipto

**Tesis Doctoral
Sandra Sánchez Urtaza
Leioa, 2023**

**Directora
Lucía Gallego Andrés**



Facultad de Medicina y Enfermería

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Doctorado en Inmunología, Microbiología y Parasitología

**Secuenciación masiva del genoma
para el estudio del resistoma y
viruloma de aislamientos clínicos
de *Acinetobacter baumannii*
procedentes de Alejandría, Egipto**

Doctoranda:

Sandra Sánchez Urtaza

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina y Enfermería – Universidad del País Vasco

Directora de tesis:

Dra. Lucía Gallego Andrés

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina y Enfermería – Universidad del País Vasco

Leioa, 2023

A mi madre,

Esta tesis no habría sido posible sin mi madre, que, aunque no entiende muy bien lo que he estado haciendo estos cuatro años, me ha apoyado en todo momento. Así que, en primer lugar, quiero agradecerle a ella todo el esfuerzo durante estos 29 años para criarme y darme todo lo que he necesitado y más. Me has dado la libertad de poder estudiar y dedicarme a lo que quería, aunque eso supusiera un esfuerzo económico enorme para ti, de verdad, mil gracias por ser la mejor madre del mundo. Eres la persona más importante de mi vida, te quiero muchísimo ama.

Quiero agradecerle a mi directora de tesis y amiga, Lucía. Estos últimos cinco años a tu lado han sido increíblemente enriquecedores para mí como persona y como científica, y espero poder seguir a tu lado por muchos años más. Has sido la mejor jefa que podría haber tenido, gracias por toda la paciencia y el cariño que me has dado, y por tantos consejos durante los descansos para el té. Trabajar en tu grupo es un verdadero placer, el ambiente tan agradable que se respira es algo que no abunda en el ámbito científico. Ojalá la pandemia nos hubiera permitido ir a más congresos y viajes juntas, pero me quedo con los buenos momentos que hemos podido disfrutar. Mil gracias por pensar en mí para prácticamente todas las oportunidades que se te han presentado, incluyendo la oportunidad de cruzar el charco y pisar Bolivia, una de las experiencias más gratificantes de mi vida. Eres una mujer increíble y una profesional como la copa de un pino, me conformo con ser una enésima parte de la gran científica que eres algún día, porque eso ya será muchísimo.

Gracias también a las personas con las que he compartido laboratorio durante esta etapa de mi vida y que me han ayudado en todo lo que he necesitado. Gracias Ane, Arrate y Ainhoa por echarme una mano con los experimentos cuando estaba desbordada, y por tantas horas de risas en el laboratorio y en los descansos para el café. A ti, Ainhoa, que acabas de empezar esta etapa, te deseo muchísimo ánimo y fuerza, y espero poder pasar más congresos tan divertidos como el de Coímbra contigo, eres una chica fantástica.

También quiero agradecer a Alain Ocampo por todos los consejos y la ayuda que me ha brindado durante estos cinco años. Eres un científico y una persona de diez y espero poder seguir en contacto contigo en el futuro.

A mis amigas Yola, Enara, Esti y Alba, porque, aunque me hayan visto menos en estos cuatro años que cuando estudiaba en Barcelona, me han animado y apoyado en todo este proceso. Muchas gracias chicas por soportar mi ausencia casi permanente, os quiero. También te agradezco a ti, Alba, mi amiga inseparable de la carrera, que, aunque solo charlemos de vez en cuando por webcam, hemos vivido este proceso juntas en la distancia y estoy muy orgullosa de ti también, doctora.

Un especial agradecimiento a mis tíos Arturo y Marisa, y a mi primo Igor, porque, aunque no entiendan muy bien qué es esto del doctorado, siempre han estado ahí interesándose y animándome en el proceso. Gracias por todo el cariño que me dais. A mi abuela Laudina, que, aunque ya está muy mayor y apenas puedo hablar con ella, me quiere y me apoya a su manera, gracias por todo el cariño de estos 29 años, abuela.

Por último, quiero agradecer a mi pareja Alexis, por todo el cariño y apoyo incondicional que me ha dado estos cuatro años. Gracias por hacerme sentir la mujer más especial del mundo y por sacarme siempre una sonrisa cuando más la necesitaba.

Gracias a todos y todas, porque esta tesis no habría sido posible sin
vuestro apoyo, gracias de corazón.

PUBLICACIONES Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

Como resultado de este trabajo de investigación se han publicado 3 artículos en revistas de alto impacto en el área de la Microbiología y la Medicina, y realizado comunicaciones a congresos internacionales.

PUBLICACIONES

Kyriaki Xanthopoulou, Mikel Urrutikoetxea-Gutiérrez, Matxalen Vidal-Garcia, José-Luis Díaz de Tuesta Del Arco, Sandra Sánchez-Urtaza, Julia Wille, Harald Seifert, Paul G Higgins, Lucía Gallego. First Report of New Delhi Metallo- β -Lactamase-6 (NDM-6) in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate From Northern Spain. *Front Microbiol.* 2020 Nov 10;11:589253.

Sandra Sánchez-Urtaza, Alain Ocampo-Sosa, Ainhoa Molins-Bengoetxea, Mohammed A El-Kholy, Marta Hernandez, David Abad, Sherine M Shawky, Itziar Alkorta, Lucia Gallego. *Molecular characterization of multidrug resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates from Alexandria, Egypt. Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Jul 20;13:1208046.

Sandra Sánchez-Urtaza, Alain Ocampo-Sosa, Ainhoa Molins-Bengoetxea, Jorge Rodríguez-Grande, Mohammed A El-Kholy, Marta Hernandez, David Abad, Sherine M Shawky, Itziar Alkorta, Lucia Gallego. *Co-Existence of bla_{NDM-1}, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-64}, bla_{PER-7} and bla_{ADC-57} in a Clinical Isolate of Acinetobacter baumannii from Alexandria, Egypt. Int J Mol Sci.* 2023 Aug 7;24(15):12515.

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

World Microbe Forum
20- 24 de junio de 2021
Online
Poster científico

Sandra Sánchez-Urtaza,
Mohammed El-Kholy, Sherine M.
Shawky, Itziar Alkorta y Lucia
Gallego. Molecular
Characterization of Carbapenem
Resistant *Acinetobacter baumannii*
Clinical Isolates from Alexandria,
Egypt

**32nd European Congress of
Clinical Microbiology and
Infectious Diseases**
23-26 de abril de 2022
Lisboa, Portugal
Poster científico

Sandra Sanchez-Urtaza, Marta
Hernández, Mohammed El-Kholy,
David Abad, Sherine M. Shawky,
Itziar Alkorta, Alain Ocampo Sosa,
Lucia Gallego. Resistome of
multidrug-resistant *Acinetobacter
baumannii* clinical isolates from
Alexandria, Egypt

**2nd Meeting of the Control of
Antibiotic Resistance in the
Mediterranean Area: Global
Solutions for a Global Threat
(CAREME) Network**
11 de diciembre de 2022
Alejandría, Egipto
Comunicación oral

Sandra Sanchez-Urtaza, Marta
Hernández, Mohammed El-Kholy,
David Abad, Sherine M. Shawky,
Itziar Alkorta, Alain Ocampo Sosa,
Lucia Gallego. Whole Genome
Sequencing Analysis of Multidrug
Resistant *Acinetobacter baumannii*
Isolates from Alexandria, Egypt

PUBLICACIONES Y CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

**13th International
Symposium on the Biology
of *Acinetobacter***
21-23 de junio de 2023
Coimbra, Portugal
1 Comunicación oral
2 Poster científicos

Sandra Sánchez-Urtaza, Ainhoa Molins-Bengoetxea, Alain Ocampo-Sosa, Marta Hernández, David Abad, Mohammed A. El-Kholy, Sherine M. Shawky, Itziar Alkorta, Lucia Gallego. Resistome and Virulome of cefiderocol resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates

Maitane Aranzamendi, Kyriaki Xanthopoulou, Ainhoa Molins, Sandra Sanchez-Urtaza, María Dolores Pérez, Jesús Oteo, Mercedes Sota, Harald Seifert, Paul G. Higgins, Lucía Gallego. Clonal Outbreak of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates harbouring the *bla*_{OXA-24/40} carbapenemase gene in an Intensive Care Unit in a Tertiary Hospital in Northern Spain

Ainhoa Molins-Bengoetxea, Sandra Sánchez-Urtaza, Alain Ocampo-Sosa, Mohammed A. El-Kholy, Sherine M. Shawky, Itziar Alkorta, Lucia Gallego. Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates carrying *bla*_{GES35}/*bla*_{OXA-23} and *bla*_{GES-11}/*bla*_{OXA-23} genes in Alexandria, Egypt

LTC Sarea Workshop
20 de julio de 2023
Bayona, Francia
Poster científico

Sandra Sánchez-Urtaza, Ainhoa Molins-Bengoetxea, Alain Ocampo-Sosa, Marta Hernández, David Abad, Mohammed A. El-Kholy, Sherine M. Shawky, Itziar Alkorta, Lucia Gallego. Resistome and Virulome of cefiderocol resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates

SUMMARY

Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* is a major global concern for healthcare settings and, according to the World Health Organization, it is considered one of the critical pathogens for which new antibiotics are urgently needed. The high rates of antibiotic resistance among these isolates are the main cause of fatal nosocomial infections including: wound infections, ventilator-associated pneumonia and other respiratory tract infections, meningitis, bacteremia, bloodstream infections and urinary tract infections. Especially, in countries of the Middle East and North Africa, antibiotic resistance rates are on the rise, mainly due to the lack of effective infection control measures and the abusive use of antibiotics. In fact, the mortality rates associated with *A. baumannii* infections in countries of the Mediterranean Area, are the ones with the highest reported mortality rates, being 68.2% in Greece, 61.4% in Turkey and 53.3% in Egypt. The multidrug resistant *A. baumannii* rates in Egypt account for the 30 and 100% of the isolates, and between 26.6% and 100% of the isolates are carbapenem resistant. Taking into account this alarming situation it is essential to investigate the molecular epidemiology of these clinically important *A. baumannii* isolates to control their dissemination. Thus, the aim of this study was to investigate the genetic features implicated in antibiotic resistance and virulence of thirty-six *A. baumannii* isolates recovered from hospitals in Alexandria, Egypt during 2020 and 2021.

For this purpose, antimicrobial susceptibility testing was performed to determine the minimum inhibitory concentrations and the antibiotic resistance rates. Antibiotic resistance genes, especially β -lactamase genes, were first identified by the use of PCR experiments and further investigated by Whole Genome Sequencing. The genetic contexts of the β -lactamase genes were also investigated by sequence analysis, which were first localized by DNA hybridization experiments. Virulence factors were also investigated by sequence analysis. Isolates were subjected to Multi Locus Sequence Typing

SUMMARY

(MLST) using Pasteur and Oxford Schemes and to core genome MLST with the aim of investigating clonal relatedness. In addition, plasmid analysis was performed first, by the use of a commercial kit and S1- Pulsed Field Gel Electrophoresis, and then by plasmid sequencing experiments combining short and long-read sequencing technologies.

High antibiotic resistance rates were found among the isolates, the majority were resistant to β -lactams (including carbapenems), fluoroquinolones, aminoglycosides and trimethoprim; and some also showed resistance to cefiderocol and minocycline. Fortunately, no colistin resistant isolates were found in this work. Typing experiments revealed that the majority of the isolates belonged to international clones IC2 and IC5, but less reported international clones such as IC4, IC7, IC8 and IC9 were also identified. An isolate was first categorized as singleton, but then, its sequence type matched with the newly described international clone IC11. Resistome analysis identified the chromosomal *bla*_{ADC-like} genes and the intrinsic *bla*_{OXA-51} gene in all the isolates, with a total of 8 *bla*_{OXA-51} variants detected: *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-65}, *bla*_{OXA-66}, *bla*_{OXA-68}, *bla*_{OXA-91}, *bla*_{OXA-94} and *bla*_{OXA-336}. It was remarkable the high prevalence of the *bla*_{OXA-23} gene and the presence of the emerging carbapenemase gene *bla*_{NDM-1} in 28% of the isolates. Additional and less frequent β -lactamase genes such as *bla*_{PER-7}, *bla*_{GES-like} and *bla*_{TEM-1} were also identified. Other antibiotic resistance genes conferring resistance to aminoglycosides, sulfonamides, tetracyclines, fluoroquinolones, chloramphenicol, trimethoprim, rifamycin and macrolides were detected. Many of these genes were coded by plasmids in some isolates and were located within transposons or class 1 integrons. A wide variety of virulence factors were observed, many of them implicated in *biofilm* production, but also involved in the production of exotoxins and exoenzymes, type II and type VI secretion systems, immune modulation and iron uptake. Biofilm production experiments showed different biofilm forming capacities among the isolates, but the majority were positive for biofilm production, a trait associated with survival in the environment of health facilities. Thirty-four isolates showed

motility phenotypes, a virulence factor important in host invasion. Finally, plasmid analysis showed a high diversity of low and high molecular weight conjugative plasmids, some of them harboring antibiotic resistance and virulence determinants.

The results obtained in this doctoral thesis turned the spotlight on the importance of investigating the molecular epidemiology of the isolates from Egypt for the implementation of infection control measures that can reduce the dissemination of these multidrug resistant clones in all the Mediterranean Area.

RESUMEN

Acinetobacter baumannii resistente a los carbapenems es una amenaza global para los centros médicos y es considerado según la Organización Mundial de la Salud, uno de los patógenos críticos para el cual se necesitan antibióticos nuevos con urgencia. Las altas tasas de resistencia a antibióticos en este tipo de aislamientos son la principal causa de infecciones hospitalarias complicadas entre las que se incluyen: infecciones de heridas, neumonía asociada a ventilación mecánica y otras infecciones del tracto respiratorio, meningitis, bacteriemia, infecciones del sistema circulatorio e infecciones del tracto urinario. Especialmente en los países del Medio Oriente y el Norte de África, las tasas de resistencia a antibióticos están aumentando de manera preocupante, principalmente debido a la falta de medidas efectivas para el control de infecciones y el uso abusivo de estos fármacos. De hecho, las tasas de mortalidad asociadas a las infecciones causadas por *A. baumannii* en los países del Área del Mediterráneo son las más altas, siendo de 68,2%, 61,4% y 53,3% en Grecia, Turquía y Egipto, respectivamente. Entre un 26,6% y un 100% de los aislamientos de *A. baumannii* en Egipto son resistentes a los carbapenems. Teniendo en cuenta esta situación tan preocupante, es primordial investigar la epidemiología molecular de estos aislamientos de *A. baumannii* clínicamente importantes para controlar su diseminación. Por eso, el objetivo de este trabajo fue investigar las características genéticas implicadas en la resistencia a antibióticos y en la virulencia de treinta y seis aislamientos de *A. baumannii* obtenidos en hospitales de Alejandría, Egipto en los años 2020 y 2021.

Para ello, se realizaron pruebas de susceptibilidad a antibióticos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias y determinar las tasas de resistencia a antibióticos. Se identificaron los genes de resistencia a antibióticos, con especial hincapié en los genes de β -lactamasas, en primer lugar, por experimentos de PCR, y posteriormente, mediante secuenciación masiva del genoma. También se analizaron las secuencias para investigar

RESUMEN

los contextos genéticos de los genes de β -lactamasas, que de manera preliminar se localizaron con experimentos de hibridación con sondas de ADN. También se buscaron los factores de virulencia mediante el análisis de las secuencias. Se emplearon las técnicas de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) de los esquemas Pasteur y Oxford y el *core genome* MLST para establecer relaciones clonales entre los aislamientos. Además, se estudió el contenido plasmídico primero mediante extracción por lisis convencional y *Pulsed Field Gel Electrophoresis* con endonucleasa S1, y posteriormente, se mapearon los plásmidos mediante la secuenciación de plásmidos combinando las tecnologías de secuenciación de lecturas cortas y largas.

Se observaron tasas de resistencia a antibióticos elevadas, la mayoría era resistente a los β -lactámicos (incluyendo los carbapenems), fluoroquinolonas, aminoglicósidos y trimetoprima; y algunas también fueron resistentes a cefiderocol y minociclina. Afortunadamente, ninguno de los aislamientos era resistente a colistina. Los experimentos de tipado mostraron una mayor prevalencia de los clones IC2 e IC5, pero también se identificaron aislamientos pertenecientes a otros clones internacionales identificados con menos frecuencia como el IC4, IC7, IC8 e IC9. Uno de los aislamientos fue clasificado como *singleton* en un inicio, sin embargo, su *sequence type* resultó coincidir con el del recientemente descrito clon IC11. El análisis del resistoma identificó los genes cromosómicos *bla*_{ADC-like} y la carbapenemasa intrínseca *bla*_{OXA-51} en todos los aislamientos, con un total de 8 variantes del gen *bla*_{OXA-51} detectadas: *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-65}, *bla*_{OXA-66}, *bla*_{OXA-68}, *bla*_{OXA-91}, *bla*_{OXA-94} y *bla*_{OXA-336}. Cabe destacar la alta prevalencia del gen *bla*_{OXA-23}, y la presencia en un 28% de los aislamientos, del gen de carbapenemasa emergente *bla*_{NDM-1}. También se identificaron otros genes de β -lactamasas menos frecuentes como *bla*_{PER-7}, *bla*_{GES-like} y *bla*_{TEM-1}. Otros genes de resistencia a antibióticos que conferían resistencia a aminoglicósidos, sulfonamidas, tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprima, rifampicina y macrólidos también fueron detectados. Muchos de estos genes de resistencia a antibióticos se encontraban codificados en

plásmidos en algunos aislamientos y dentro de transposones o integrones de clase 1. Se observó una gran variedad de factores de virulencia entre los aislamientos, la mayoría de ellos implicados en la producción de *biofilm*, pero también en la producción de exotoxinas y exoenzimas, en sistemas de secreción tipo II y tipo VI, en la modulación del sistema inmune y en la adquisición de hierro. Los experimentos de formación de *biofilm* mostraron diferentes grados de producción entre los aislamientos, pero la mayoría dio positivo en formación de *biofilm*, un rasgo asociado a la persistencia en el ambiente hospitalario. Treinta y cuatro aislamientos mostraron fenotipos de motilidad, un factor de virulencia importante en la invasión del huésped. Finalmente, el análisis plasmídico mostró diversidad de plásmidos de bajo y alto peso molecular, estos últimos conjugativos, de los cuales algunos contenían determinantes de resistencia a antibióticos y de virulencia.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral dejaron en evidencia la importancia de investigar la epidemiología molecular de los aislamientos egipcios para la implementación de medidas de control de infecciones que puedan reducir la diseminación de estos clones multirresistentes en toda el Área del Mediterráneo.



ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS	i
LISTADO DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	vi
INTRODUCCIÓN	1
1. El género <i>Acinetobacter</i>	3
1.1. Clasificación taxonómica actual	4
1.2. Hábitat	11
1.3. Identificación a nivel de especie	12
1.4. Especies de importancia clínica	15
1.4.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
1.4.2. <i>Acinetobacter nosocomialis</i>	18
1.4.3. <i>Acinetobacter pittii</i>	18
2. Virulencia de <i>Acinetobacter baumannii</i>	19
2.1. Proteínas de membrana externa o <i>Outer Membrane Proteins</i> (OMPs)	19
2.2. Vesículas de membrana externa o <i>Outer Membrane Vesicles</i> (OMV)	20
2.3. Factores de la envuelta celular	20
2.4. Enzimas proteolíticas	20
2.5. Resistencia a la desecación y la desinfección	20
2.6. Motilidad	21
2.7. Sistemas de adquisición de metales	22
2.8. Sistemas de secreción de proteínas	22
2.9. <i>Penicillin-binding proteins</i> (PBPs)	23
2.10. Producción de <i>biofilm</i> y <i>quorum sensing</i>	23
3. Antimicrobianos para el tratamiento de infecciones por <i>A. baumannii</i>	24
3.1. β -lactámicos	25
3.2. Aminoglicósidos	26
3.3. Fluoroquinolonas	26
3.4. Polimixinas	26
3.5. Tetraciclinas	27
3.6. Diaminopirimidinas-Sulfonamidas	27
4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	27
4.1. β -lactamasas	28
4.2. Defectos en la permeabilidad de la membrana	30

ÍNDICE

4.3.	Bombas de eflujo	31
4.3.1.	MATE	32
4.3.2.	ABC	32
4.3.3.	PACE	33
4.3.4.	MFS	33
4.3.5.	SMR	34
4.3.6.	RND	34
4.4.	Enzimas modificadoras de aminoglicósidos	35
4.5.	Modificaciones de diana	36
5.	Métodos de evaluación de la susceptibilidad a antibióticos	37
5.1.	Método de difusión en disco	37
5.2.	Método de dilución en agar	37
5.3.	Método de dilución en caldo	38
5.4.	Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia	38
6.	Elementos genéticos móviles	39
6.1.	Secuencias de inserción y transposones	39
6.2.	Integrones	42
6.3.	Islas genómicas de resistencia	43
6.4.	Plásmidos	44
7.	Epidemiología de <i>Acinetobacter baumannii</i>	47
7.1.	Tipado molecular	47
7.2.	Epidemiología a nivel mundial	49
7.3.	Epidemiología en Egipto y Oriente Medio	50
7.4.	Epidemiología en el Área del Mediterráneo	52
OBJETIVOS		53
MATERIALES Y MÉTODOS		57
MATERIALES		59
1.	Aislamientos bacterianos	59
2.	Cepas de referencia	61
3.	Medios de cultivo y de conservación	61
4.	Materiales y reactivos	63
5.	Soluciones <i>stock</i>	66

6. Primers	69
7. Equipamiento	71
MÉTODOS	72
1. Identificación a nivel de especie	72
1.1. Sistemas semi-automáticos	72
1.2. Multiplex PCR para genes <i>gyrB</i>	73
1.3. Detección mediante PCR del gen <i>bla_{OXA-51}</i> , intrínseco en <i>A. baumannii</i>	74
1.4. Secuenciación masiva del genoma	74
2. Determinación de susceptibilidad a antibióticos	75
2.1. Sistemas semi-automáticos	75
2.2. Método de microdilución en caldo	75
2.3. Método de Kirby-Bauer (disco-placa)	76
2.4. Método del Épsilon test	77
3. Identificación de genes de resistencia a los antibióticos	77
3.1. Detección de genes de carbapenemasas <i>bla_{OXA}</i> y metalo- β -lactamasas por multiplex PCR	77
3.2. Identificación del resistoma mediante secuenciación masiva del genoma	79
3.3. Análisis del entorno genético de los genes de betalactamasas	79
4. Identificación y estudio de los factores de virulencia	79
4.1. Identificación del viruloma mediante secuenciación masiva del genoma	79
4.2. Experimentos de formación de <i>biofilm</i>	80
4.3. Experimentos de motilidad	81
5. Tipado molecular y estudio de la epidemiología molecular mediante secuenciación masiva del genoma	82
5.1. Asignación de cada aislamiento a un Clon Internacional mediante la determinación de la variante del gen <i>bla_{OXA-51}</i>	82
5.2. <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST)	82
5.3. <i>Core genome Multi Locus Sequence Typing</i> (cgMLST)	82
6. Análisis plasmídico	83
6.1. Extracción de plásmidos mediante kit comercial	83
6.2. <i>S1-Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	84
6.3. Tipado de replicones en <i>A. baumannii</i> mediante PCR	87

6.4.	Secuenciación y resolución de plásmidos por MinION y ensamblaje híbrido	88
7.	Determinación de la localización genética de los genes de resistencia a antibióticos <i>bla</i>_{NDM-1}, <i>bla</i>_{PER-7} y <i>bla</i>_{GES-like} mediante <i>Southern blot</i> e hibridación con sondas de ADN marcadas con digoxigenina	89
7.1.	Elaboración de las sondas de ADN	89
7.2.	<i>Southern blot</i>	91
7.3.	Hibridación con sondas de ADN	93
RESULTADOS		95
1.	Identificación de los aislamientos estudiados a nivel de especie	97
2.	Características de las muestras estudiadas	98
3.	Susceptibilidad a antibióticos	98
4.	Tipado molecular	102
5.	Análisis del viruloma	105
6.	Análisis de la expresión fenotípica de algunas características de virulencia	113
6.1.	Producción de <i>biofilm</i>	113
6.2.	Estudio de la motilidad	114
7.	Análisis del resistoma	114
8.	Estudio del contexto genético de los genes de β-lactamasas	123
8.1.	Contexto genético de los genes de carbapenemasas	123
8.2.	Contexto genético de otros genes de β -lactamasas	125
9.	Plásmidos y localización de los genes de resistencia a antibióticos	127
DISCUSIÓN		145
CONCLUSIONES		165
REFERENCIAS		169

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y nomenclatura actual de las especies del género <i>Acinetobacter</i> .	5
Tabla 2. Clasificación de β -lactamasas descritas en <i>A. baumannii</i> .	30
Tabla 3. Clases de antibióticos utilizados para clasificar los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> spp. en MDR, XDR y PDR.	38
Tabla 4. Características de los aislamientos recogidos en los hospitales de Alejandría, Egipto entre agosto de 2020 y febrero de 2021.	59
Tabla 5. Primers empleados para la identificación por PCR de las especies del complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> mediante la amplificación diferenciada del gen <i>gyrB</i> .	69
Tabla 6. Primers empleados para la identificación por PCR de los genes de carbapenemasas tipo <i>bla_{OXA}</i> característicos en <i>A. baumannii</i> .	69
Tabla 7. Primers empleados para la identificación por multiplex-PCR de otros genes de carbapenemasas tipo OXA, secuencias de inserción tipo <i>ISAba1</i> asociadas al gen <i>bla_{OXA-51}</i> y metalo- β -lactamasas.	70
Tabla 8. Primers empleados para la elaboración de sondas de ADN marcadas con digoxigenina.	70
Tabla 9. Composición de la solución de lisis GP para la elaboración de dados empleados en PFGE.	85
Tabla 10. Modo de preparación de la solución GN para la elaboración de los dados empleados en PFGE.	85
Tabla 11. Condiciones para la puesta en marcha de la electroforesis PFGE.	87
Tabla 12. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los aislamientos <i>A. baumannii</i> estudiados.	100
Tabla 13. Viruloma de los aislamientos <i>A. baumannii</i> pertenecientes al clon IC2.	106
Tabla 14. Viruloma de los aislamientos <i>A. baumannii</i> pertenecientes al clon IC4.	107

Tabla 15. Viruloma de los aislamientos <i>A. baumannii</i> pertenecientes al clon IC5.____	108
Tabla 16. Viruloma del aislamiento <i>A. baumannii</i> perteneciente al clon IC7. _____	109
Tabla 17. Viruloma del aislamiento <i>A. baumannii</i> perteneciente al clon IC8. _____	110
Tabla 18. Viruloma de los aislamientos <i>A. baumannii</i> pertenecientes al clon IC9.____	111
Tabla 19. Viruloma del aislamiento <i>A. baumannii</i> Ale30. _____	112
Tabla 20. Genes de β -lactamasas encontrados por secuenciación masiva del genoma en los aislamientos estudiados. _____	117
Tabla 21. Genes de resistencia adicionales identificados por secuenciación masiva del genoma en los aislamientos estudiados. _____	119
Tabla 22. Genes de bombas de eflujo identificados en los aislamientos estudiados.	121
Tabla 23. Perfiles plasmídicos de los aislamientos estudiados obtenidos por lisis convencional y S1-PFGE. _____	128
Tabla 24. Replicasas identificadas por PCR en los aislamientos de <i>A. baumannii</i> estudiados. _____	130
Tabla 25. Plásmidos identificados por secuenciación y replicasas detectadas por comparación con la base de datos <i>Acinetobacter Plasmid Typing database</i> (https://github.com/MehradHamidian/AcinetobacterPlasmidTyping) con un 95% de identidad mínima. _____	133

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Imagen en microscopía electrónica de barrido de un cultivo líquido de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	3
Figura 2. Diagrama de los primers empleados y tamaños esperados de los productos amplificados de la técnica de multiplex PCR del gen <i>gyrB</i> .	13
Figura 3. Representación esquemática de los factores de virulencia de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	19
Figura 4. Dianas bacterianas de los antibióticos empleados más comúnmente en la práctica clínica para tratar infecciones producidas por <i>A. baumannii</i> .	25
Figura 5. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de resistencia de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	28
Figura 6. Esquema de las diferentes superfamilias de bombas de eflujo descritas en <i>A. baumannii</i> .	32
Figura 7. Estructura de los transposones simples (a) y compuestos (b).	40
Figura 8. Estructuras genéticas de los transposones que contienen el gen <i>bla_{OXA-23}</i> .	42
Figura 9. Estructura de los plásmidos en el género <i>Acinetobacter</i> .	45
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la técnica multiplex PCR del gen <i>gyrB</i> de los aislamientos de Alejandría.	97
Figura 11. Porcentajes de los diferentes tipos de muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislamientos de <i>A. baumannii</i> estudiados.	98
Figura 12. Resultados de resistencia a antibióticos* de los aislamientos de <i>A. baumannii</i> estudiados.	99
Figura 13. Árbol de expansión mínima de los 36 aislamientos de <i>A. baumannii</i> basado en 2390 alelos (genoma central) generado con Ridom SeqSphere+.	104
Figura 14. Datos de las medias \pm desviaciones estándar de la producción de biofilm de los aislamientos de <i>A. baumannii</i> .	113

Figura 15. Fenotipos de motilidad observados en algunos aislamientos de <i>A. baumannii</i> .	114
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de las técnicas multiplex PCR para los diferentes genes de carbapenemasas.	115
Figura 17. Diferentes contextos genéticos de las variantes del gen <i>bla</i> _{OXA-23} encontradas en los aislamientos de Alejandría.	123
Figura 18. Contexto genético de las variantes del gen <i>bla</i> _{OXA-51} de los aislamientos estudiados.	124
Figura 19. Contexto genético del gen <i>bla</i> _{NDM-1} en los aislamientos estudiados.	125
Figura 20. Contexto genético del gen <i>bla</i> _{PER-7} en los aislamientos estudiados.	125
Figura 21. Contexto genético de las variantes del gen <i>bla</i> _{GES} en los aislamientos estudiados.	126
Figura 22. Contexto genético de las variantes del gen <i>bla</i> _{ADC} en los aislamientos estudiados.	126
Figura 23. Contexto genético del gen <i>bla</i> _{TEM-1} en los aislamientos estudiados.	126
Figura 24. Ejemplos de los perfiles plasmídicos identificados en los aislamientos de <i>A. baumannii</i> mediante lisis convencional.	127
Figura 25. Plásmidos identificados por S1-PFGE.	128
Figura 26. Ejemplos de hibridaciones con sondas de ADN de diferentes genes de β -lactamasas de los aislamientos estudiados.	132
Figura 27. Plásmido pAbAle9 identificado por secuenciación masiva en el aislamiento Ale9.	134
Figura 28. Plásmidos pAbAle10.1 y pAbAle10.2 identificados por secuenciación masiva en el aislamiento Ale10.	135
Figura 29. Plásmido pAbAle18 identificado por secuenciación masiva en el aislamiento Ale18.	136

Figura 30. <i>Plásmido pAbAle20 identificado por secuenciación masiva en el aislamiento Ale20.</i>	137
Figura 31. <i>Plásmidos pAbAle21.1, pAbAle21.2, pAbAle21.3 y pAbAle21.4 identificados por secuenciación masiva en el aislamiento Ale21.</i>	138
Figura 32. <i>Plásmidos pAbAle25.1, pAbAle25.2, pAbAle25.3 y pAbAle25.4 identificados por secuenciación masiva en el aislamiento Ale25.</i>	141
Figura 33. <i>Plásmidos pAbAle26.1 y pAbAle26.2 identificados por secuenciación masiva en el aislamiento Ale26.</i>	144

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
AAC	Acetiltransferasa
ABC	<i>ATP-Binding Cassette superfamily</i>
AB-PBRT	<i>Acinetobacter baumannii PCR-Based Replicon Typing</i>
Acel	<i>Acinetobacter chlorhexidine efflux protein</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AHL	Acil Homoserina Lactonas
AME	<i>Aminoglycoside Modifying Enzyme</i>
AMK	Amikacina
AmpC	<i>Ambler class C cephalosporinase</i>
ANI	Average Nucleotide Identity
ANT	Adeniltransferasa
APH	Fosfotransferasa
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
ArmA	<i>Aminoglycoside resistance methylase</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
ARNm	ARN mensajero
Ata	<i>Acinetobacter trimeric autotransporter</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bap	<i>Biofilm associated protein</i>
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato
bla	<i>β-lactamase gene</i>
bla_{ADC}	<i>Acinetobacter Derived Cefalosporinase</i>
bla_{GES}	<i>Guiana Extended-Spectrum β-lactamase gene</i>

<i>bla</i>_{GIM}	<i>German imipenemase gene</i>
<i>bla</i>_{IMP}	<i>Imipenemase metallo-β-lactamase gene</i>
<i>bla</i>_{KPC}	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase gene</i>
<i>bla</i>_{NDM}	<i>New Delhi metallo- β-lactamase gene</i>
<i>bla</i>_{PER}	<i>Pseudomonas Extended Resistant gene</i>
<i>bla</i>_{SPM}	<i>Sao Paulo metallo- β-lactamase gene</i>
<i>bla</i>_{TEM}	<i>Temoneira β-lactamase gene</i>
<i>bla</i>_{VIM}	<i>Verone integron-encoded metallo- β-lactamase gene</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLDB	<i>Beta-Lactamase DataBase</i>
bp	<i>Base pair</i>
CarO	<i>Carbapenem-associated resistance protein</i>
CAZ	<i>Ceftazidima</i>
CC	<i>Complejo Clonal</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CECT	<i>Colección Española de Cultivos Tipo</i>
cgMLST	<i>Core genome Multi Locus Sequence Typing</i>
CIP	<i>Ciprofloxacino</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	<i>Centímetro</i>
CMI	<i>Concentración Mínima Inhibitoria</i>
CpaA	<i>Glycan-specific adamalysin-like protease</i>
<i>cpn60</i>	<i>60-kDa chaperonin gene</i>
CST	<i>Colistina</i>
Csu	<i>Chaperon/usher pilus system</i>
DAP	<i>1,3-diaminopropano</i>
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
DDH	<i>DNA-DNA hybridization</i>
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
Dfr	<i>Trimethoprim resistant dihydrofolate reductase</i>
dGTP	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i>

ABREVIATURAS

DIG	Digoxigenina
DLV	<i>Double Locus Variant</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
DR	<i>Direct Repeat</i>
dTTP	<i>Thymidine triphosphate</i>
dUTP	<i>Deoxyuridine Triphosphate</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEO	Electroendosmosis
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
<i>epsA</i>	<i>Polysaccharide export outer membrane protein</i>
ESBL	<i>Extended Spectrum β-Lactamases</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
F	Forward
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDC	Cefiderocol
FEP	Cefepima
<i>fusA</i>	<i>Elongation factor EF-G</i>
g	Gramo
<i>gdhB</i>	<i>Glucose dehydrogenase B gene</i>
GEN	Gentamicina
<i>gltA</i>	<i>Citrate synthase gene</i>
<i>gpi</i>	<i>Glucose-6-phosphate isomerase gene</i>
<i>gyrA</i>	<i>DNA gyrase subunit A gene</i>
<i>gyrB</i>	<i>DNA gyrase subunit B gene</i>
HCl	Ácido clorhídrico
IC	<i>International Clone</i>
IPM	Imipenem
IR	<i>Inverted repeat</i>
IS	<i>Insertion sequence</i>
ISCR	<i>Insertion Sequence Common Region</i>
ITU	Infecciones del tracto urinario

Kb	Kilobase
KDa	Kilo Dalton
L	Litro
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	<i>MS Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MARR	<i>Multiple Antibiotic Resistance Region</i>
MATE	<i>Multi-drug And Toxic compound Extrusion family</i>
MBL	<i>Metallo-β-Lactamase</i>
MDR	<i>Multidrug-Resistant</i>
MEM	Meropenem
MFP	<i>Membrane Fusion Protein</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
mg	Miligramo
MIN	Minociclina
mL	Mililitro
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NBT	Cloruro de NitroBlue Tetrazolium
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
ng	Nanogramo
NRAMP	<i>Natural Resistance-associated macrophage protein</i>
OGRI	<i>Overall Genome Relatedness Indices</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMV	<i>Outer Membrane Vesicle</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
oriT	<i>Origin of transfer</i>

ABREVIATURAS

OXA	Oxacillinasa
p/v	Peso/volumen
PACE	<i>Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux family</i>
PAP	<i>Periplasmic Adapter Protein</i>
<i>parC</i>	<i>Topoisomerase IV subunit C</i>
PBP	<i>Penicillin-Binding Protein</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain Reaction</i>
PDR	<i>Pandrug-Resistant</i>
PMF	<i>Peptide-Mass-Fingerprint</i>
PNAG	Poli- β -1,6-N-acetilglucosamina
PRL	Piperacilina
<i>ptk</i>	<i>Putative protein tyrosine kinase gene</i>
<i>pyrG</i>	<i>CTP synthase gene</i>
QacE	<i>Quaternary ammonium compounds resistance gene</i>
R	<i>Reverse</i>
<i>recA</i>	<i>Homologous recombination factor</i>
Rep	<i>Replication initiator proteins</i>
RI	<i>Resistance Island</i>
RmtB	<i>16S rRNA methyltransferase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RND	<i>Resistance-Nodulation-cell Division family</i>
<i>rplB</i>	<i>50S ribosomal protein L2 gene</i>
<i>rpoB</i>	<i>RNA polymerase subunit B gene</i>
<i>rpoD</i>	<i>RNA polymerase sigma factor gene</i>
S1-PFGE	<i>S1 endonuclease-Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIM	<i>Seoul imipenemase</i>
SLV	<i>Single Locus Variant</i>
SMR	<i>Small Multi-drug Resistance family</i>
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate buffer</i>
ST	<i>Sequence Type</i>
Sul	<i>Sulfonamide resistant dihydropteroate synthase</i>

SXT	Trimetoprima/sulfametoxazol
T2SS	<i>Type 2 Secretion System</i>
T6SS	<i>Type 6 Secretion System</i>
TBE	<i>Tris-Borate-EDTA buffer</i>
TBS	Tris buffer salino
TCC	Ticarcilina/ácido clavulánico
TE	<i>Tris-EDTA buffer</i>
TetM	<i>Tetracycline resistance gene</i>
TIC	Ticarcilina
TOB	Tobramicina
TZP	Piperacilina/tazobactam
U	Unidades
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VFDB	<i>Virulence Factors DataBase</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El género *Acinetobacter*

Las bacterias del género *Acinetobacter* son cocobacilos gram-negativos no flagelados estrictamente aerobios, catalasa positivos, oxidasa negativos y no fermentadores. Suelen tener un tamaño de entre 1-1,5 μm por 1,5-2,5 μm durante la fase exponencial y adquieren una morfología más típica de cocos agrupados en cadena durante la fase estacionaria, sin embargo, son organismos pleomórficos que pueden presentar morfologías muy diversas dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 1) (1, 2). Las especies de importancia clínica de *Acinetobacter* crecen fácilmente a 35-37°C formando colonias lisas y mucosas en medio sólido, sin embargo, *Acinetobacter baumannii* es la única especie del género capaz de crecer a 44°C mientras que las especies ambientales solo crecen a temperaturas de entre 20-30°C (3). En placas de agar sangre las colonias son blanquecinas, lisas y pueden ser mucoides, mientras que en agar MacConkey son de un lila claro indicando que no fermentan la lactosa (1).

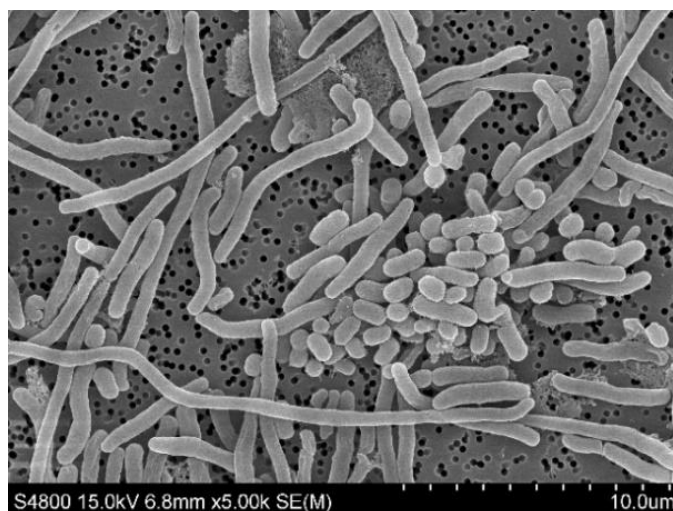


Figura 1. Imagen en microscopía electrónica de barrido de un cultivo líquido de *Acinetobacter baumannii*. Obtenida de <https://www.jrl-environmental-antibiotic-resistance.eus/wp-content/uploads/2021/09/>.

Acinetobacter spp. tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles con condiciones desfavorables de humedad y nutrientes como es el caso del material hospitalario, dispositivos médicos, batas, superficies e incluso las propias manos del personal sanitario (4). Esto a menudo es origen de brotes hospitalarios debido a que muchas de estas especies de importancia clínica como, por ejemplo, *A. baumannii*, *A. haemolyticus* y *A. calcoaceticus*, pueden tener genes de resistencia a antibióticos que dificultan el tratamiento de los y las pacientes (5).

1.1. Clasificación taxonómica actual

Las bacterias del género *Acinetobacter* pertenecen a la familia *Moraxellaceae* y al orden de los Pseudomonadales. Sin embargo, la historia taxonómica del género ha sido compleja desde su primera descripción en 1911 por Beijerinck, que asignó al primer aislamiento el nombre de *Micrococcus calcoaceticus*. Desde entonces, los miembros del género han sido nombrados de múltiples maneras como *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha* y *Moraxella lwoffii* (1).

El género *Acinetobacter* fue propuesto por primera vez por Brisou y Prévot en 1954, basándose en la palabra griega “*akinetos*” que significa no móvil, aunque posteriormente se ha comprobado que efectivamente pueden presentar dos tipos de motilidad: *twitching motility* y *surface-associated motility* (6). Esta denominación fue ampliamente aceptada por la comunidad científica tras la publicación del estudio de Baumann en 1968 (7). Desde entonces, se han realizado numerosos estudios para definir y actualizar su taxonomía y se han descrito un total de 82 especies validas publicadas, 13 con designación provisional de especie y 16 con nombre de especie publicado, pero no valido (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación y nomenclatura actual de las especies del género *Acinetobacter*. Obtenida de <http://apps.szu.cz/anemec/>.

Nombre de especie válido publicado (<i>n</i> =82)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. albensis</i>	Krizova et al. 2015b	Suelo, agua
<i>A. amyesii</i>	Nemec et al. 2022b	Suelo, agua, animales
<i>A. apis</i>	Kim et al. 2014	<i>Apis mellifera</i>
<i>A. baretiae</i>	Alvarez-Perez et al. 2021	<i>Apis mellifera</i>
<i>A. baumannii</i>	Bouvet & Grimont 1986	Humanos, animales de sangre caliente
<i>A. baylyi</i>	Carr et al. 2003	Lodo activado, suelo
<i>A. beijerinckii</i>	Nemec et al. 2009	Humano, animales, suelo, agua
<i>A. bereziniae</i>	Nemec et al. 2010, Bouvet & Grimont 1986	Humano
<i>A. bohemicus</i>	Krizova et al. 2014	Suelo, agua
<i>A. boissieri</i>	Álvarez-Pérez et al. 2013	Néctar de flores
<i>A. bouvetii</i>	Carr et al. 2003	Lodo activado
<i>A. brisouii</i>	Anandham et al. 2010	Turba
<i>A. calcoaceticus</i>	Bouvet & Grimont 1986	Suelo, agua, humano
<i>A. celticus</i>	Radolfova-Krizova et al. 2016b	Suelo, agua
<i>A. chengduensis</i>	Qin et al. 2020	Aguas residuales hospitalarias
<i>A. chinensis</i>	Hu et al. 2019	Aguas residuales hospitalarias
<i>A. colistiniresistens</i>	Nemec et al. 2017, Bouvet & Jeanjean 1989	Humano
<i>A. courvalinii</i>	Nemec et al. 2016, Bouvet & Jeanjean 1989	Humano, animales
<i>A. cumulans</i>	Qin et al. 2019	Aguas residuales hospitalarias
<i>A. defluvii</i>	Hu et al. 2017	Aguas residuales hospitalarias

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Continuación.

Nombre de especie válido publicado (<i>n</i> =82)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. dijkshoorniae</i> (= <i>A. lactucaae</i>)	Cosgaya et al. 2016, Dunlap & Rooney 2017	Humano, agua
<i>A. dispersus</i>	Nemec et al. 2016, Bouvet & Jeanjean 1989	Suelo, agua, humano
<i>A. equi</i>	Poppel et al. 2016	Caballo
<i>A. gandensis</i>	Smet et al. 2014	Caballo, ganado, agua
<i>A. geminorum</i>	Wolf et al. 2021	Humano
<i>A. gernerii</i>	Carr et al. 2003	Lodo activado
<i>A. grimontii</i> (= <i>A. junii</i>)	Carr et al. 2003, Vaneechoutte et al. 2008	Lodo activado
<i>A. guangdongensis</i> (= <i>A. indicus</i>)	Feng et al. 2014a, Nemec & Radolfova-Krizova 2017	Mineral de plomo y zinc
<i>A. guerrae</i>	Carvalho et al. 2020	Carne
<i>A. guillouiae</i>	Nemec et al. 2010, Bouvet & Grimont 1986	Suelo, agua, humano
<i>A. gyllenbergii</i>	Nemec et al. 2009	Humano
<i>A. haemolyticus</i>	Bouvet & Grimont 1986	Humano
<i>A. halotolerans</i>	Dahal et al. 2017	Suelo
<i>A. harbinensis</i>	Li et al. 2014b	Agua de río
<i>A. ihumii</i>	Yacouba et al. 2022	Humano
<i>A. indicus</i>	Malhotra et al. 2012	Suelo
<i>A. johnsonii</i>	Bouvet & Grimont 1986	Suelo, agua, humano, animales
<i>A. junii</i>	Bouvet & Grimont 1986	Humano, animales, agua, suelo
<i>A. kanungonis</i>	Das et al. 2021	Pez globo
<i>A. kookii</i>	Choi et al. 2013	Suelo, agua

Tabla 1. Continuación.

Nombre de especie válido publicado (<i>n</i> =82)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. lactucae</i>	Rooney et al. 2016	Lechuga
<i>A. lanii</i>	Zhu et al. 2021	Heces de <i>Equus kiang</i>
<i>A. larvae</i>	Liu et al. 2017	Intestino de larva de polilla
<i>A. lwoffii</i>	Bouvet & Grimont 1986; Nemec et al. 2019	Humano, animales, suelo, agua
<i>A. modestus</i>	Nemec et al. 2016, Touchon et al. 2014	Humano, agua
<i>A. nectaris</i>	Alvarez-Perez et al. 2013	Néctar de flores
<i>A. nosocomialis</i>	Nemec et al. 2011, Tjernberg & Ursing 1989	Humano
<i>A. pakistanensis</i> (= <i>A. bohemicus</i>)	Abbas et al. 2014, Nemec & Radolfova-Krizova 2016	Agua residual
<i>A. parvus</i>	Nemec et al. 2003	Humano, animales
<i>A. piscicola</i>	Liu et al. 2018	Pez
<i>A. pittii</i>	Nemec et al. 2011, Bouvet & Grimont 1986	Humano, suelo, agua
<i>A. pollinis</i>	Alvarez-Perez et al. 2021	Néctar de flores
<i>A. populi</i>	Li et al. 2015	Corteza de <i>Populus</i>
<i>A. portensis</i>	Carvalho et al. 2020	Carne
<i>A. pragensis</i>	Radolfova-Krizova et al. 2016a	Suelo, agua
<i>A. proteolyticus</i>	Nemec et al. 2016, Touchon et al. 2014	Humano
<i>A. pseudolwoffii</i>	Bouvet & Grimont 1986; Nemec et al. 2019	Humano, animales, suelo, agua
<i>A. puyangensis</i>	Li et al. 2013	Corteza de <i>Populus</i>
<i>A. qingfengensis</i>	Li et al. 2014a	Corteza de <i>Populus</i>

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Continuación.

Nombre de especie válido publicado (<i>n</i> =82)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. radioresistens</i>	Nishimura et al. 1988, Bouvet & Grimont 1986	Humano, suelo, algodón
<i>A. rathckeae</i>	Alvarez-Perez et al. 2021	Néctar de flores
<i>A. rudis</i>	Vaz-Moreira et al. 2011	Leche cruda, agua residual
<i>A. schindleri</i>	Nemec et al. 2001	Humano, animales
<i>A. sedimenti</i>	Zheng et al. 2022	Sedimento de playa
<i>A. seifertii</i>	Nemec et al. 2015, Gerner-Smidt & Tjernberg 1993	Humano
<i>A. shaoyimingii</i>	Zhu et al. 2021	Heces de <i>Equus kiang</i>
<i>A. sichuanensis</i>	Qin et al. 2018	Aguas residuales hospitalarias
<i>A. silvestris</i>	Nemec et al. 2022a	Suelo forestal, agua
<i>A. soli</i>	Kim et al. 2008	Humano, suelo
<i>A. stercoris</i>	Pulami et al. 2021	Digestato de planta de biogas
<i>A. tandoii</i>	Carr et al. 2003	Lodo activado, agua, suelo
<i>A. terrae</i>	Nemec et al. 2021	Suelo, heces de oveja
<i>A. terrestris</i>	Nemec et al. 2021	Suelo, heces animales
<i>A. tibetensis</i>	Pan et al. 2023	Suelo
<i>A. tjernbergiae</i>	Carr et al. 2003	Lodo activado
<i>A. towneri</i>	Carr et al. 2003	Lodo activado, agua, suelo
<i>A. ursingii</i>	Nemec et al. 2001	Humano
<i>A. variabilis</i>	Krizova et al. 2015a	Humano, animales, suelo
<i>A. venetianus</i>	Vaneechoutte et al. 2009, Di Cello et al. 1997	Agua salada

Tabla 1. Continuación.

Nombre de especie válido publicado (<i>n</i> =82)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. vivianii</i>	Nemec et al. 2016, Touchon et al. 2014	Humano, suelo, agua
<i>A. wanghuae</i>	Zhu et al. 2021	Heces de <i>Equus kiang</i>
<i>A. wuhouensis</i>	Hu et al. 2018	Aguas residuales hospitalarias
Designación provisional de especies (<i>n</i> =13)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. antiviralis</i>	Lee et al. 2009	Raíces de planta de tabaco
Candidatus <i>A. avistercoris</i>	Gilroy et al. 2021	Heces de <i>Gallus gallus</i> (metagenoma)
Candidatus <i>A. pediculi</i>	Boumbanda Koyo et al. 2019	<i>Pediculus humanus</i>
Genomic sp. 6	Bouvet & Grimont 1986	Humano
Genomic sp. 15BJ	Bouvet & Jeanjean 1989	Humano
Genomic sp. 16	Bouvet & Jeanjean 1989	Humano
Taxon 21	Touchon et al. 2014	Humano
Taxon 22	Touchon et al. 2014	Humano
Taxon 24C	Nemec et al. 2021	Suelo, heces de oveja
Taxon 24D	Nemec et al. 2021	Suelo, agua
Taxon 24E	Nemec et al. 2021	Suelo, agua
Taxon 25A, 25B, 27, 32, 34, 37–39	Nemec & Radolfova-Krizova (no publicado)	Suelo, agua
Taxon 40–95	Qin et al. 2021	Miscelánea
Nombre de especie publicado, pero no válido (<i>n</i> =16)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. faecalis</i>	Chen et al. 2023	Heces de elefante

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Continuación.

Nombre de especie publicado, pero no válido (n =16)	Referencia	Fuente de aislamiento
<i>A. kyonggiensis</i>	Lee & Lee 2010	Planta de tratamiento de aguas residuales
<i>A. marinus</i>	Yoon et al. 2007	Agua de mar
<i>A. nematophilus</i>	Machado et al. 2023	Nemátodo
<i>A. oleivorans</i>	Kang et al. 2011	Suelo
<i>A. pecorum</i>	Gilroy et al. 2021	Heces de <i>Gallus gallus</i>
<i>A. pullicarnis</i>	Han et al. 2020	Carne de pollo
<i>A. rongchengensis</i>	Qin et al. 2021	Aguas residuales hospitalarias
<i>A. tianfuensis</i>	Qin et al. 2021	Aguas residuales hospitalarias
<i>A. mesopotamicus</i> (= <i>A. lwoffii</i>)	Acer et al. 2020, Nemeč 2021	Suelo
<i>A. oryzae</i> (= <i>A. johnsonii</i>)	Chaudhary et al. 2012, Nemeč 2022	Arroz
<i>A. plantarum</i> (= <i>A. junii</i>)	Du et al. 2016, Nemeč 2022	Trigo
<i>A. pullorum</i> (= <i>A. portensis</i>)	Elnar et al. 2020, Qin et al. 2021	Carne de pollo
<i>A. refrigeratoris</i> (= <i>A. variabilis</i>)	Feng et al. 2014b, Nemeč 2022	Nevera
<i>A. seohaensis</i> (= <i>A. towneri</i>)	Yoon et al. 2007, Nemeč 2022	Agua de mar
<i>A. septicus</i> (= <i>A. ursingii</i>)	Kilic et al. 2008, Nemeč et al. 2008	Humano

En particular, el complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*, incluye las especies más frecuentemente identificadas y que son responsables de un mayor porcentaje de infecciones nosocomiales (5, 8). Aunque el complejo estaba compuesto por cuatro especies denominadas *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus*, recientemente, se han

incluido dos nuevas especies dentro del complejo: *Acinetobacter seifertii* y *Acinetobacter dijkshoorniae*. Por lo que, actualmente, el complejo está compuesto por cinco especies patógenas: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii*, *A. dijkshoorniae*; y *A. calcoaceticus*, una especie mayormente medioambiental, aunque se ha descrito en casos de bacteriemia y neumonía (9, 10).

1.2. Hábitat

Los miembros del género *Acinetobacter* son organismos extremadamente versátiles que se encuentran frecuentemente tanto en el medioambiente como en el ambiente hospitalario y pueden infectar tanto a animales como a humanos (11). Se han encontrado especies del género en ambientes muy variados como suelos, ríos, aguas residuales tanto hospitalarias como comunitarias, plantas, comida e incluso en el tracto digestivo de algunos animales (Tabla 1). Además, algunas especies como *A. baumannii* pueden formar parte de la microbiota de la piel en adultos sanos (8), diferentes estudios han aislado *Acinetobacter* de la nariz, orejas, garganta, tráquea, conjuntiva, manos, vagina o axila entre otras (1).

A pesar de que *A. baumannii* es la especie de mayor relevancia clínica y, por ello, la más estudiada, su hábitat natural sigue siendo desconocido. Aunque se han descrito aislamientos en todo tipo de ambientes, incluyendo animales y medioambiente, se aísla frecuentemente en el equipamiento y dispositivos de los centros médicos: almohadas, colchones, espirómetros, tubos de ventiladores mecánicos o catéteres, incluso en el personal sanitario (1). Dada su presencia en prácticamente todo el ambiente hospitalario y su capacidad de persistencia en condiciones extremas, se dan las condiciones idóneas para los brotes infecciosos en los centros de salud.

1.3. Identificación a nivel de especie

La identificación a nivel de especie no es sencilla dentro del género *Acinetobacter*. La gran similitud entre las especies dentro del género dificulta su diferenciación por métodos fenotípicos y bioquímicos, especialmente entre las que pertenecen al complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (12).

El primer método de identificación a nivel de especie vino de la mano de Bouvet y Grimont en 1986, basado en 28 test fenotípicos que incluían pruebas fisiológicas, nutricionales y enzimáticas (13). Posteriores modificaciones del método mejoraron la identificación incluyendo el crecimiento a diferentes temperaturas, acidificación de la glucosa, producción de gelatinasa, hemólisis y crecimiento en diferentes fuentes de carbono (14).

Las técnicas moleculares, por contrapartida, ofrecen una identificación más rápida y precisa requerida en la rutina de los laboratorios clínicos (15). El método de referencia durante los últimos 50 años ha sido la hibridación ADN-ADN (*DNA-DNA Hybridization* [DDH]), sin embargo, se trata de un método muy laborioso, que requiere mucho tiempo y proclive a errores por lo que ha sido sustituido por técnicas basadas en secuenciación (15).

Existen otras técnicas basadas en el análisis de las secuencias de ADN como el análisis de restricción de ADNr amplificado (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* [ARDRA]), el análisis de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* [AFLP]) y el ribotipado. En la técnica ARDRA, se amplifica por PCR el 16S ADNr, se digiere con enzimas de restricción concretas y el patrón resultante se compara con los patrones existentes (16). En el análisis AFLP se digiere el genoma bacteriano al completo y se realiza una amplificación por PCR cuyos perfiles se comparan para identificar la especie (17). El ribotipado consiste en una digestión del ADN completo que posteriormente se corre en una electroforesis y es transferido por *Southern blot* e hibridado

con una sonda marcada de ADNr creando un perfil específico de especie (18).

Las técnicas anteriores se tornan complicadas y requieren mucho tiempo, por ello se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación y secuenciación de diferentes genes para establecer una relación entre los organismos a identificar y las secuencias de las cepas de referencia. Para la identificación de *Acinetobacter* se emplean los genes del 16S ARNr, *rpoB*, *recA* y la región espaciadora intergénica 16S–23S (15). Sin embargo, cabe destacar, que la secuenciación del gen del 16S ARNr es altamente precisa para la identificación a nivel de género, pero no tiene suficiente resolución para discriminar a nivel de especie, para lo que es más adecuado el gen *rpoB* dada su variabilidad entre especies (19). También se emplea la multiplex PCR del gen *gyrB* para diferenciar algunas de las especies del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. nosocomialis* y *A. pittii*) (Figura 2) (20). Sin embargo, este método no permite diferenciar las dos especies recientemente incluidas dentro del complejo: *A. seifertii* y *A. dijkshoorniae*.

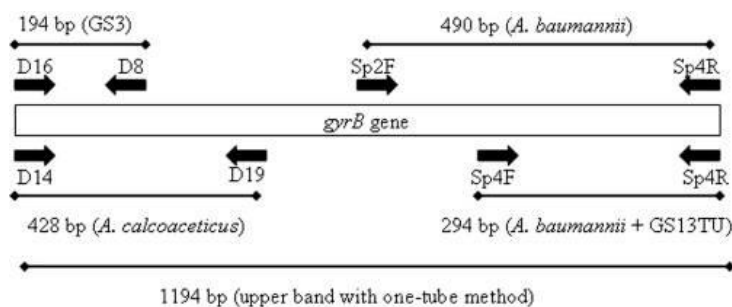


Figura 2. Diagrama de los *primers* empleados y tamaños esperados de los productos amplificados de la técnica de multiplex PCR del gen *gyrB*. Imagen obtenida de Higgins PG et al. *Journal of Clinical Microbiology* (2010) (20).

Para la identificación de los aislamientos de *A. baumannii* en concreto, se emplea también la amplificación por PCR del gen de carbapenemasa *bla*_{OXA-51} que es intrínseco de la especie (21). Sin embargo, este método por sí solo puede llevar a una identificación errónea, ya que se ha descrito este

INTRODUCCIÓN

gen en plásmidos de aislamientos de *A. nosocomialis* y en especies genómicas cercanas (22).

La disponibilidad y accesibilidad de la secuenciación masiva del genoma ha permitido facilitar la identificación de especie mediante el cálculo de los índices generales de relación genómica (*Overall Genome Relatedness Indices*, OGRI) y comparándolos con los de las cepas de referencia. Estos índices se pueden calcular mediante BLAST+ utilizando la herramienta en línea JSpecies WS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>). De los OGRI disponibles, el considerado como referencia es el índice de identidad media de nucleótidos o *Average Nucleotide Identity* (ANI), cuyos valores deben ser superiores al 95% para considerar que pertenece a la misma especie que la cepa de referencia (23).

Actualmente, y a nivel hospitalario o en la rutina clínica, los sistemas semi-automáticos son la mejor opción por su sencillez y la rápida obtención de resultados. Los más utilizados son VITEK®2 y MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), ambos basados en aspectos fenotípicos (15). El sistema VITEK®2 emplea la fluorescencia para tomar medidas de la acidificación o alcalinización, la hidrólisis enzimática y el crecimiento en presencia de sustancias inhibitoras para identificar la especie bacteriana (24). La identificación por MALDI-TOF, en cambio, se prepara cubriendo la muestra del aislamiento con una matriz orgánica que absorbe energía y que cristaliza al secarse, cristalizando así la muestra también. A continuación, se somete la muestra a pulsos de luz láser que ionizan y separan las moléculas que son aceleradas por un campo electrostático y analizadas en base a su masa y el tiempo que tardan en pasar por el analizador (los iones más pequeños viajan más rápidamente que los iones más grandes). Se produce un patrón denominado *characteristic peptide-mass-fingerprint* (PMF), el cual es específico de la especie y puede ser comparado con los patrones de las especies descritas en la base de datos (16). Aunque ambos métodos son útiles en la identificación rápida de

microorganismos en la práctica clínica, están limitados por los organismos descritos en las bases de datos y pueden llevar a identificaciones erróneas cuando se trata de nuevas especies (16, 25).

1.4. Especies de importancia clínica

No todas las especies del género *Acinetobacter* son de importancia clínica, sin embargo, la mayoría de las especies del complejo *A. calcoaceticus-A.baumannii* producen infecciones en humanos y son o pueden ser potencialmente importantes en el futuro. El patógeno más relevante en clínica y el más estudiado es *A. baumannii*, sin embargo, otras especies como *A. nosocomialis* o *A. pittii* también son patógenos importantes (2).

1.4.1. *Acinetobacter baumannii*

Hasta la década de 1970, los aislamientos de *A. baumannii* todavía eran susceptibles a antibióticos como ampicilina, gentamicina o cloranfenicol, sin embargo, cinco años después ya se empezaban a describir altas tasas de resistencia en aislamientos de la especie (3, 26). Actualmente, se han descrito mundialmente aislamientos resistentes a todas las clases de antibióticos incluyendo los de última elección, como los carbapenems o la colistina (3, 27, 28, 29).

Es por ello que *A. baumannii* forma parte del grupo de microorganismos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*), en el que se incluyen aquellos patógenos de importancia clínica con una alta tasa de resistencia a los antibióticos. También ha sido catalogado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como patógeno prioritario para el que se requiere urgentemente el desarrollo de nuevos antibióticos (26, 30).

INTRODUCCIÓN

De todas las especies de relevancia clínica, *A. baumannii* es la más importante, ya que es la responsable del 80% de las infecciones causadas por especies del género *Acinetobacter* (15). Este patógeno puede colonizar diferentes áreas del cuerpo de pacientes hospitalizados, especialmente aquellas con un alto contenido en fluidos como el tracto respiratorio y urinario y la cavidad peritoneal, pero también la piel y el sistema circulatorio (1). Los tipos de infecciones más comunes causadas por aislamientos de *A. baumannii* son los siguientes:

- Infecciones respiratorias: la mayoría de aislamientos de *A. baumannii* se aíslan de pacientes hospitalizados con infecciones respiratorias (1). De hecho, en Europa y Estados Unidos, entre un 8 y un 14% de los casos de neumonía asociada a ventilación mecánica son producidos por *A. baumannii*, aunque este porcentaje es aún más alto en Asia, Latinoamérica y algunos países de Oriente Medio rondando entre el 19% y más del 50% (2). La mayoría de los casos de neumonía de origen nosocomial son descritos en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y las tasas de mortalidad están en rangos de entre el 30 y 70% (1). Las neumonías adquiridas en la comunidad muy raramente son producidas por *A. baumannii*, sin embargo, en aquellos pacientes con un historial de abuso de alcohol o con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), se han identificado casos de neumonía adquirida en la comunidad causada por *A. baumannii* (1). Por otro lado, este patógeno puede producir fácilmente bronquiolitis y traqueobronquitis adquiridas en la comunidad en niñas y niños sanos y en adultos inmunosuprimidos (1).
- Infecciones del torrente sanguíneo: la mortalidad por este tipo de infecciones provocadas por *A. baumannii* es en torno al 40%, principalmente provocadas por catéteres del tracto respiratorio o intravenosos, y menos frecuentemente por heridas quirúrgicas, infecciones del tracto urinario o endocarditis (2). En pacientes con cáncer, este organismo es responsable del 68% de los casos de bacteriemia según un estudio en Brasil (31). El 13% las bacteriemias producidas en pacientes de

neurocirugía son causadas por *A. baumannii*, y solo el 10% eran susceptibles a los carbapenems (32). Otro estudio mostró que durante 4 años consecutivos *A. baumannii* era el patógeno más aislado en bacteriemias de pacientes de UCI con quemaduras severas y, además, los aislamientos eran resistentes a todos los antibióticos excepto a minociclina y polimixina B (33). El tratamiento previo con antibióticos de amplio espectro, las quemaduras, la inmunosupresión, la cirugía previa, las estancias en UCI, la ventilación mecánica, las heridas o los catéteres son algunos de los factores de riesgo (34).

- Infecciones de la piel o de tejidos blandos: es muy común encontrar aislamientos de *A. baumannii* en pacientes civiles con quemaduras severas o heridas, sin embargo, es más frecuentemente aislado (32.5% de los casos) en víctimas de conflictos armados como los de Irak y Afganistán (1). De los pacientes militares con quemaduras severas, aquellos con infección por *A. baumannii* tienen mayores estancias hospitalarias y una mayor mortalidad que aquellos sin infección. Además, el porcentaje de aislamientos multirresistentes es mayor en las víctimas de guerra (52%) que en los pacientes locales (20%) (2).
- Infecciones del tracto urinario (ITU): uno de cada 5 aislamientos de *A. baumannii* son recuperados de órganos del tracto urinario, principalmente por colonizaciones de catéteres urinarios (2). Sin embargo, *A. baumannii* solo es responsable del 1,6% de ITU adquiridas en UCI y es poco usual que produzca este tipo de infecciones en pacientes sanos (1, 2).
- Meningitis: los casos de meningitis nosocomial producida por *A. baumannii* suponen una amenaza cada vez mayor, llegando a producir hasta un 70% de mortalidad en UCI. Y es que aproximadamente un 21% de los aislamientos en infecciones postcirugía neurológica eran sensibles solo a colistina o tigeciclina (2). *A. baumannii* es responsable en el 10% de los casos de meningitis por bacilos gram-negativos (1).

- Otro tipo de infecciones: aunque en menor medida, existen casos de endocarditis producida por *A. baumannii* principalmente debidas a la presencia del patógeno en válvulas protésicas. También puede causar peritonitis, oftalmitis o queratitis asociada al uso de lentillas o tras operaciones oftalmológicas (1).

1.4.2. *Acinetobacter nosocomialis*

Según estudios recientes, *A. nosocomialis* ha sido identificado en un 66% de los casos de bacteriemia producidos por el complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* (15). En un estudio llevado a cabo en Tailandia, se comprobó que la mortalidad producida por *A. nosocomialis* era similar a la producida por *A. baumannii*, con mortalidades del 33 y 36%, respectivamente, y que ambos patógenos eran responsables de infecciones adquiridas en la comunidad en un 29% y 35%, respectivamente (35). Teniendo en cuenta que ambas especies son difíciles de diferenciar por las técnicas de identificación empleadas en la rutina de los laboratorios, es complicado discernir cuál es la incidencia real de esta especie a nivel clínico, aunque los estudios cada vez dejan más en evidencia su importancia.

1.4.3. *Acinetobacter pittii*

Esta especie se identifica en un 24% de los casos de bacteriemia producidos por el complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* (15). Un estudio multicéntrico llevado a cabo en Japón en 2020 señaló a *Acinetobacter pittii* como la especie más común en infecciones invasivas causadas por *Acinetobacter spp.* (36). Además, ya han sido descritos aislamientos de *A. pittii* multirresistentes a los carbapenems y a las quinolonas en diferentes continentes, aunque las cepas panresistentes son aún muy raramente descritas (37). Por todo ello, y por su similitud con la especie *A. baumannii*, *A. pittii* está siendo cada vez más reconocido como patógeno importante causante de infecciones nosocomiales.

2. Virulencia de *Acinetobacter baumannii*

El éxito clínico de *Acinetobacter baumannii* se debe, en gran parte, a su capacidad de persistencia en el ambiente hospitalario y a su gran plasticidad genómica, que le permite adquirir genes determinantes en su virulencia. En los últimos años, se han podido identificar factores de virulencia importantes en su patogenicidad (Figura 3), aunque aún queda mucho por conocer.

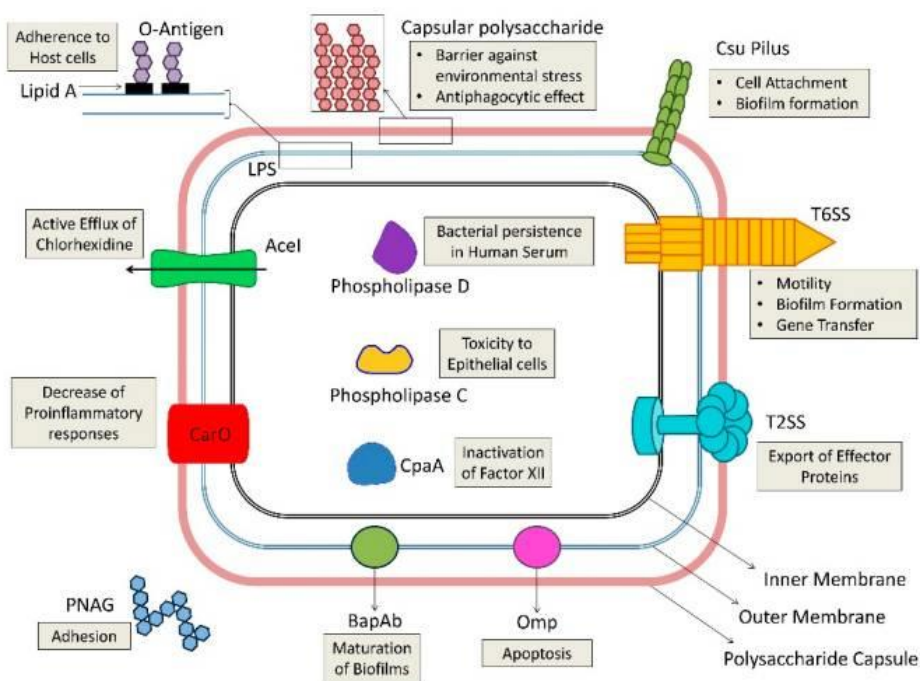


Figura 3. Representación esquemática de los factores de virulencia de *Acinetobacter baumannii*. Acel: *Acinetobacter* chlorhexidine efflux protein; CpaA: *glycan-specific adamalysin-like protease*; CsU: chaperon/usher pilus system; LPS: lipopolisacárido; Omp: *outer membrane protein*; PNAG: poli- β -1,6-N-acetilglucosamina; T2SS: sistema de secreción tipo II; T6SS: sistema de secreción tipo VI. Imagen obtenida de Moubareck CA *et al. Antibiotics* (2020) (2).

2.1. Proteínas de membrana externa o *Outer Membrane Proteins* (OMPs)

La proteína de membrana externa más importante en *A. baumannii* es OmpA, que además de su función como porina, tiene un rol importante en la invasión celular. Se une a la superficie de la célula huésped induciendo su apoptosis y facilitando la internalización de la bacteria. También tiene la

INTRODUCCIÓN

capacidad de facilitar la diseminación al torrente sanguíneo aumentando la capacidad de producir una bacteriemia. Otras proteínas de membrana externa de *A. baumannii* son Omp33-36 y CarO, que son claves en la resistencia a carbapenems (2).

2.2. Vesículas de membrana externa o *Outer Membrane Vesicles* (OMV)

Las vesículas de membrana externa están implicadas en la protección contra el sistema inmunitario, el transporte de factores de virulencia, la transferencia de genes y el *quorum sensing* (2, 38).

2.3. Factores de la envuelta celular

El lipopolisacárido (LPS) de *A. baumannii* está involucrado en la adherencia y la supervivencia dentro del huésped. Otro factor importante es la cápsula, que actúa como protección frente a condiciones ambientales adversas como la sequedad o algunos antimicrobianos y muy efectiva en la supervivencia dentro del huésped. Los genes *ptk* (*putative protein tyrosine kinase*) y *epsA* (*polysaccharide export outer membrane protein*) son importantes para la formación de la cápsula (2).

2.4. Enzimas proteolíticas

Acinetobacter baumannii puede producir fosfolipasas, que tienen actividad lipolítica, hidrolizando los fosfolípidos de las membranas de las células del huésped. Hasta el momento se han descrito dos: la fosfolipasa D permite a la bacteria sobrevivir en el suero humano, mientras que la fosfolipasa C es tóxica para las células epiteliales (2).

2.5. Resistencia a la desecación y la desinfección

La capacidad de resistencia a los ambientes extremadamente secos, permite a *A. baumannii* sobrevivir hasta 100 días en estas condiciones. Como se ha mencionado anteriormente, esta característica está relacionada con la presencia de cápsula y, también, con la composición de la membrana

externa. *Acinetobacter baumannii* también es capaz de sobrevivir en presencia de agentes desinfectantes como la clorhexidina o el etanol. Por un lado, la bomba de eflujo de clorhexidina (Acel) permite su expulsión fuera de la célula, y el etanol disminuye la fagocitosis y promueve tanto el crecimiento como la virulencia de *A. baumannii* (2). Otra estrategia empleada, es la inducción del estado viable no cultivable, mediante el cual las bacterias no son capaces de crecer en medios de cultivo en el laboratorio, pero siguen presentando actividad metabólica basal y pueden tener capacidad patogénica (39). Esta característica, les permite sobrevivir por largos períodos de tiempo en condiciones ambientales adversas.

2.6. Motilidad

Aunque las bacterias del género *Acinetobacter* han sido históricamente consideradas como no motiles y, de hecho, su nombre viene derivado de esa afirmación, hoy en día sabemos que esto no es cierto y que sí presentan ciertos tipos de motilidad. A pesar de la ausencia de flagelos, estos organismos pueden diseminarse por las superficies por dos tipos de motilidad: la motilidad espasmódica o *twitching motility* y la motilidad asociada a superficie o *surface-associated motility*. Las bacterias que presentan *twitching motility*, emplean los pili tipo IV para extenderse y retraerse y desplazarse así por el medio. Sin embargo, aquellos aislamientos que presentan *surface-associated motility*, además de los pili tipo IV, requieren también de la producción y síntesis de lipo-oligosacáridos y 1,3-diaminopropano (DAP) y del *quorum sensing* (2, 38). La motilidad es un factor de virulencia que contribuye a la supervivencia dentro del huésped, estudios recientes han mostrado que los aislamientos aislados de sangre presentaban una mayor motilidad que los aislados en esputos, sugiriendo que la capacidad móvil del aislamiento es determinante para su supervivencia en ciertas zonas de infección (38).

2.7. Sistemas de adquisición de metales

Acinetobacter baumannii es capaz de sobrevivir en ambientes con baja concentración de metales gracias a los mecanismos de secuestro de hierro, zinc y manganeso. Esto es especialmente importante para poder adquirir y utilizar el hierro contenido en el grupo hemo de la sangre del huésped durante la infección (2). El mecanismo principal responsable de la adquisición de hierro en la especie es la producción de moléculas con alta afinidad por el hierro llamadas sideróforos. En *A. baumannii*, los sideróforos más conservados son las acinetobactinas parte de la familia *catechol-hydroxymate siderophores*, aunque otros sideróforos dentro de esta familia también utilizados por *A. baumannii* son las fimsbactinas A-F y las baumannoferrinas A y B. Además de los sistemas de captación de hierro, *A. baumannii* también posee un sistema de captación de zinc muy eficiente, el sistema ZnuABC, que le permite hacer frente al efecto de la calcoproteína humana y sobrevivir dentro del huésped. Los mecanismos para la captación de manganeso son menos conocidos, sin embargo, se cree que la presencia de un transportador de la familia de la *resistance-associated macrophage protein* (NRAMP) puede estar implicado (38).

2.8. Sistemas de secreción de proteínas

Este tipo de sistemas permite a las bacterias interactuar con el medio y con otros organismos presentes en él. El primer sistema de secreción que se identificó en *Acinetobacter baumannii* fue el *trimeric autotransporter* (Ata), implicado en la adhesión a las matrices extracelulares del huésped y en la producción de *biofilm* y presente en muchos aislamientos. Otro de los sistemas de secreción importantes en *A. baumannii* es el sistema de secreción tipo II (*type II secretion system* [T2SS]). Uno de los efectores del T2SS más importantes es CpaA (*glycan-specific adamalysin-like protease*), que es capaz de inhibir la coagulación sanguínea evitando la formación de trombos y facilitando la diseminación de *A. baumannii*. Por último, el sistema de secreción tipo VI (*type VI secretion system* [T6SS]), un sistema defensivo

presente en muchas otras bacterias gram-negativas, permite a los aislamientos de *A. baumannii* lanzar toxinas frente a otras bacterias cercanas y mejorar así su supervivencia (2, 38).

2.9. Penicillin-binding proteins (PBPs)

Estas proteínas actúan en la síntesis de peptidoglicano, la molécula principal que compone la pared bacteriana. La proteína PBP-7/8 juega un papel importante en el crecimiento, la morfología celular y la supervivencia de *Acinetobacter baumannii*.

2.10. Producción de *biofilm* y *quorum sensing*

De todos los factores de virulencia, la capacidad de formación de *biofilm* se considera una de las más importantes en la patogénesis de *A. baumannii*. Los *biofilm* están compuestos por un conjunto de microorganismos encapsulados en una matriz extracelular que los protege de agresiones externas como los antibióticos, el sistema inmune o la desecación. De hecho, estas estructuras pueden formarse en superficies tanto abióticas (material y equipamiento hospitalario) como bióticas (áreas anatómicas) y estar formados por microorganismos de diferentes especies facilitando la transferencia horizontal de genes de virulencia y su diseminación (2). Aunque parece que los factores implicados en la producción de *biofilm* son muy dependientes de la cepa en cuestión, existen algunos factores en común importantes: los pili Csu (*type I chaperone-usheer pilus system*), regulados por los sistemas BfmRS y GacSA, son responsables de la producción de la cápsula y de la adhesión en superficies abióticas; las proteínas Bap (*biofilm associated proteins*), responsables de la adhesión célula-célula y de la maduración del *biofilm* en superficies abióticas, y en algunas cepas podemos encontrar las *Bap-like proteins* BLP1 y BLP2, también implicadas en la maduración; la proteína *RTX-like domain-containing protein* implicada en el desarrollo del *biofilm*; el polisacárido extracelular PNAG (poli- β -1,6-N-acetilglucosamina), implicado en la adhesión célula-célula, en la formación de agregados y en la protección frente al sistema inmune; la proteína de

membrana externa OmpA, involucrada en la adhesión a superficies bióticas; y el transportador Ata, implicado en la adhesión a los componentes de la matriz extracelular del huésped y, por tanto, en el mantenimiento del *biofilm*.

Además de los factores mencionados, se cree que el *quorum sensing* es clave en la formación de *biofilm*. Se trata del lenguaje utilizado por las bacterias para comunicarse empleando moléculas señalizadoras. Las proteínas AbaI y AbaR forman parte de este mecanismo disparando la sobreproducción de acil homoserina lactonas (AHL) que regulan la formación de *biofilm* (2, 38).

3. Antimicrobianos para el tratamiento de infecciones por *A. baumannii*

Un antimicrobiano por definición, es un agente natural o sintético que mata los microorganismos o inhibe su crecimiento. Aquellos capaces de matar organismos bacterianos se denominan bactericidas y los que inhiben su crecimiento se denominan bacteriostáticos. Dentro de los antimicrobianos encontramos los antibióticos, que son aquellos que se emplean para tratar a pacientes con infecciones bacterianas. Existe una gran variedad de antibióticos con diferentes modos de acción y dianas (Figura 4). Algunos de estos antibióticos se emplean para tratar infecciones producidas por *A. baumannii*.

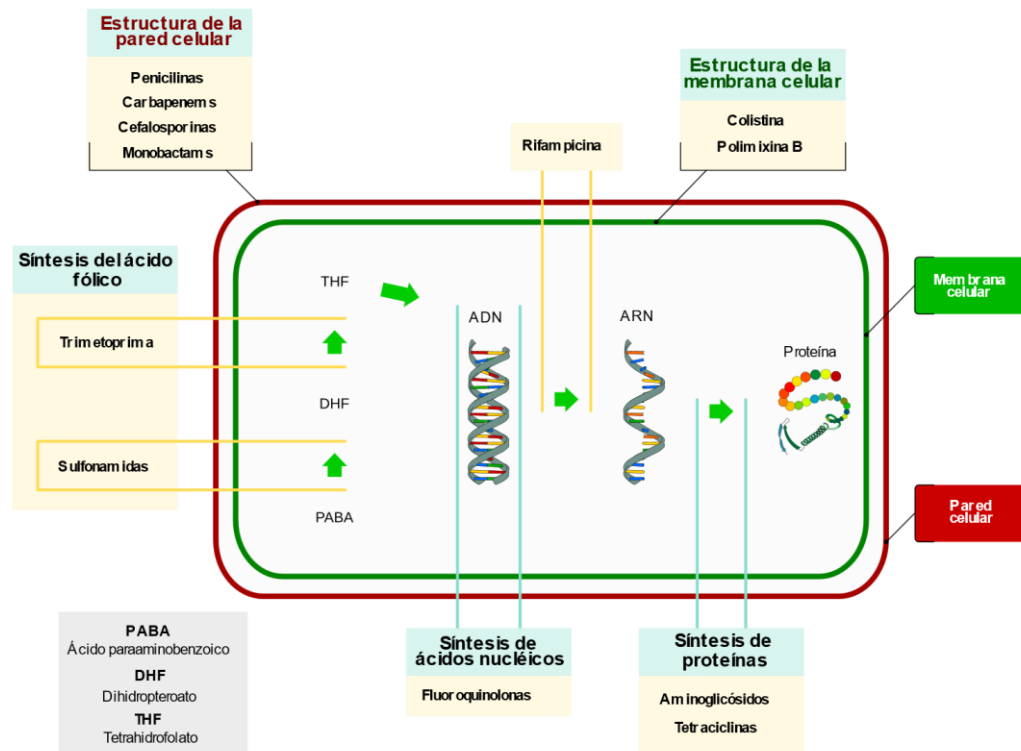


Figura 4. Dianas bacterianas de los antibióticos empleados más comúnmente en la práctica clínica para tratar infecciones producidas por *A. baumannii*. Adaptada de J Raghu (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=61673300>).

3.1. β -lactámicos

Los antibióticos de este grupo inhiben la síntesis de la pared bacteriana bloqueando la transpeptidación en la síntesis de peptidoglicano y su diana son las *Penicillin Binding Proteins* (PBPs). Todos ellos tienen un anillo β -lactámico en su estructura, de ahí su nombre. Dentro de este grupo se encuentran las penicilinas (ampicilina, amoxicilina, piperacilina, ticarcilina), los carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem), las cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefepima, cefiderocol) y los monobactams (aztreonam) (40). Las infecciones por *A. baumannii* susceptibles a antibióticos se suelen tratar con cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima o cefepime) o β -lactámicos combinados con inhibidores de β -lactamasas (ampicilina/sulbactam) (34). Sin embargo, como última alternativa

terapéutica se emplean imipenem, meropenem y cefiderocol, ya que es difícil encontrar aislamientos sensibles al resto de β -lactámicos actualmente (1).

3.2. Aminoglicósidos

Los aminoglicósidos son antibióticos que interfieren en la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma y provocando una lectura errónea del ARNm que termina de manera prematura la traducción. Los antibióticos de esta categoría son ototóxicos y nefrotóxicos por lo que su uso se restringe a casos muy extremos (40). Algunos ejemplos de aminoglicósidos utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por *A. baumannii* son amikacina, gentamicina y tobramicina, aunque se suelen combinar con otros agentes antimicrobianos en casos de aislamientos resistentes a aminoglicósidos (amikacina + imipenem) (1).

3.3. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son derivados de las quinolonas que interfieren en el proceso de replicación, transcripción y división celular uniéndose a la topoisomerasa II o ADN girasa e inhibiéndola (40). Algunas fluoroquinolonas empleadas para tratar infecciones por *A. baumannii* son ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y norfloxacino (41). En ocasiones, también se combinan con β -lactámicos (imipenem + ciprofloxacino).

3.4. Polimixinas

Las polimixinas son un grupo de antibióticos que crean poros en la membrana celular disrumpiendo la bicapa de fosfolípidos y llevando a la muerte celular (41). Este mecanismo puede afectar también las membranas celulares de los humanos, por eso estos antibióticos tienen una alta nefrotoxicidad y neurotoxicidad y sólo se emplean en casos extremos de neumonía, bacteriemia o sepsis. La polimixina B y la polimixina E (colistina) son los antibióticos de este grupo, empleados principalmente para tratar infecciones producidas por *A. baumannii* resistente a los carbapenems (1). También se ha empleado la combinación de carbapenems y polimixinas para

tratar infecciones muy complicadas, sin embargo, no hay suficiente evidencia de su efectividad (34).

3.5. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos que interfieren en la síntesis de proteínas mediante la unión reversible a la subunidad 30S del ribosoma impidiendo la unión del ARNt al complejo ribosoma-ARNm (40). Ejemplos de este grupo de antibióticos utilizados para tratar infecciones causadas por *A. baumannii* son minociclina y tigeciclina, aunque es muy común encontrar aislamientos resistentes debido a la sobreexpresión de bombas de eflujo (1).

3.6. Diaminopirimidinas-Sulfonamidas

Las diaminopirimidinas (trimetoprima) y las sulfamidas (sulfametoxazol) son antibióticos que interfieren en la ruta metabólica de la síntesis de folato por inhibición competitiva. El sulfametoxazol evita la síntesis del ácido dihidropterico al inicio de la ruta, mientras que la trimetoprima actúa al final impidiendo la síntesis del ácido tetrahidrofólico (40). Ambos antibióticos son sinérgicos por lo que se suelen emplear en combinación en el tratamiento de las infecciones.

4. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Aunque el desarrollo de resistencias a los antibióticos es un proceso natural, el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y el consumo inadecuado de estos durante las últimas décadas, ha aumentado alarmantemente el número de aislamientos resistentes (42). Los mecanismos de resistencia a los antibióticos pueden ser innatos (intrínsecos) o adquiridos, y estar codificados tanto en el cromosoma como en plásmidos. En *A. baumannii* estos se clasifican en cinco categorías (Figura 5) (1).

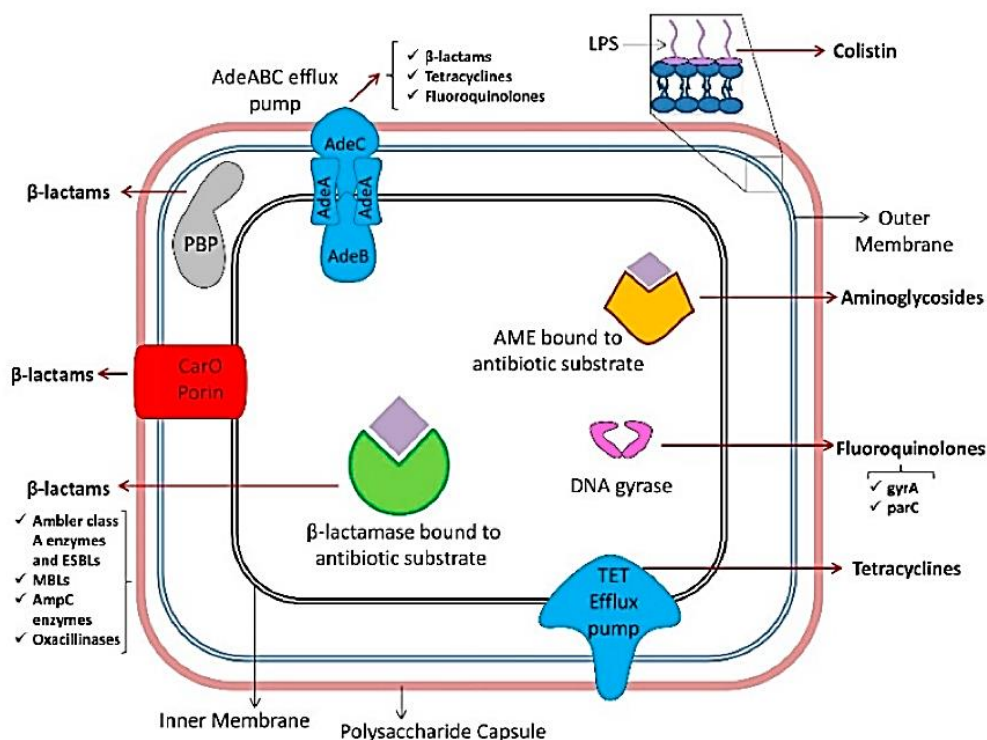


Figura 5. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de resistencia de *Acinetobacter baumannii*. AME: Aminoglycoside Modifying Enzyme; AmpC: Ambler class C cephalosporinases; ESBLs: Extended-Spectrum β -Lactamases; MBLs: Metallo- β -Lactamases; LPS: Lipopolysaccharide; PBP: Penicillin Binding Protein. Imagen obtenida de Moubareck CA et al. *Antibiotics* (2020) (2).

4.1. β -lactamasas

La hidrólisis enzimática mediante la acción de las β -lactamasas es el mecanismo más importante en la resistencia a los antibióticos del grupo de los β -lactámicos. Según la clasificación de Ambler, estas enzimas se dividen en cuatro clases (A, B, C y D). Las enzimas de las clases A, C y D son serin- β -lactamasas e hidrolizan los antibióticos en dos pasos implicando un sitio activo de serina y una molécula de H_2O ; mientras que las enzimas de clase B son metalo- β -lactamasas e hidrolizan los antibióticos en un solo paso que implica un sitio activo de uno o dos iones de zinc y una molécula de H_2O (43). En la Tabla 2 se muestra un resumen de las β -lactamasas descritas en *A. baumannii*.

Las β -lactamasas de clase A hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, monobactams y algunas incluso carbapenems, y la mayoría son susceptibles a la acción de inhibidores de β -lactamasas clásicos como el ácido clavulánico y el sulbactam. Estas enzimas pueden ser de espectro reducido, de espectro extendido o carbapenemasas. Las de espectro reducido son activas frente a penicilinas. Las de espectro extendido pueden hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam. Y las carbapenemasas además, hidrolizan los carbapenems (43, 44). Algunas de las enzimas de este grupo descritas en *A. baumannii* incluyen: TEM-1, TEM-2, TEM-92, TEM-116, SHV-12, GES-11, GES-14, PER-1, PER-7, VEB-1, CTX-M, KPC (1, 45, 46).

Las β -lactamasas de clase B son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos incluyendo los carbapenems, excepto los monobactams, y no se ven afectados por inhibidores de β -lactamasas pero sí por quelantes de metales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se han descrito cuatro enzimas de este grupo en *A. baumannii* que incluyen IMP-like, VIM-like, NDM-like, y SIM-1 (1, 45, 46).

Las β -lactamasas de clase C inhiben penicilinas, aztreonam y la mayoría de cefalosporinas excepto cefepima, además, son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas clásicos. *Acinetobacter baumannii* tiene una β -lactamasa intrínseca codificada en el cromosoma, la cefalosporinasa ADC (*Acinetobacter derived cephalosporinase*). Es común encontrar la secuencia de inserción IS*Aba1* o IS*Aba125* upstream del gen *bla*_{ADC} aumentando su expresión (1, 45, 46).

Las β -lactamasas de clase D, también llamadas oxacilinasas, pueden hidrolizar toda clase de β -lactámicos y son las carbapenemasas más frecuentemente encontradas y el principal mecanismo de resistencia a carbapenems en *A. baumannii*. Además, normalmente no son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas clásicos (43). Hasta la fecha se han descrito un total de 1250 variantes OXA (47). Dentro de esta familia de carbapenemasas

INTRODUCCIÓN

se diferencian cinco grupos de oxacilinasas presentes en *A. baumannii*: la OXA-51, intrínseca de la especie; y las OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 y OXA-235, adquiridas. Todas ellas pueden contenerse tanto en el cromosoma como en plásmidos. Algunos de los genes de oxacilinasas, al igual que pasa con los genes *bla_{ADC}*, suelen ir acompañados de secuencias *IS_{Aba1}* o *IS_{Aba125}* *upstream* del gen, aumentando la expresión del gen y por tanto produciendo fenotipos de alta resistencia a carbapenems (1, 45, 46).

Tabla 2. Clasificación de β -lactamasas descritas en *A. baumannii*. *Carbapenemasas (1, 45, 46, 48).

β -lactamasas			
Clase A	Clase B*	Clase C	Clase D*
TEM-1, TEM-2, TEM-92, TEM-116	IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8, IMP-11, IMP-14a, IMP-19, IMP-55	ADC-like	OXA-51-like (intrínseca), OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like, OXA-235-like
SHV-12	VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-6, VIM-11, VIM-25		
GES-11, GES-12, GES-14, GES-35	NDM-1, NDM-2, NDM-3, NDM-5, NDM-6, NDM-7		
PER-1, PER-7	SIM-1		
VEB-1			
CTX-M			
KPC-2*, KPC-3*, KPC-4*, KPC-10*			

4.2. Defectos en la permeabilidad de la membrana

Las proteínas de membrana externa, también llamadas porinas, juegan un papel muy importante en el paso de sustancias al periplasma. Por ello, un mecanismo de resistencia importante es la reducción de la expresión de estas porinas, que puede combinarse con la producción de β -lactamasas para aumentar la resistencia. Algunas de las porinas que se expresan en menor

medida en la resistencia a carbapenems son CarO, Omp22-33, Omp29, Omp33-36, Omp37, Omp43, Omp44 y Omp47. OmpA en cambio, se ha relacionado con la resistencia a aztreonam, cloranfenicol y ácido nalidíxico. Los lipopolisacáridos también juegan un papel importante en la permeabilidad de la membrana, la pérdida o modificación de estas moléculas puede poner en riesgo su integridad facilitando el paso de antibióticos como la colistina (1, 45, 46).

4.3. Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son un mecanismo importante en la resistencia a los antibióticos de *A. baumannii*, ya que confieren resistencia a múltiples clases de antibióticos e incluso a antisépticos y desinfectantes. Hasta la fecha, se han identificado seis superfamilias de bombas de eflujo en *A. baumannii*: *Multidrug and Toxic compound Extrusion family* (MATE), *ATP-Binding Cassette family* (ABC), *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux family* (PACE), *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Small Multidrug Resistance family* (SMR) y *Resistance Nodulation and cell Division family* (RND). Todas ellas están localizadas en la membrana interna, a excepción de la familia RND y algunos transportadores ABC, que se extienden hasta la membrana externa (Figura 6) (49, 50, 51).

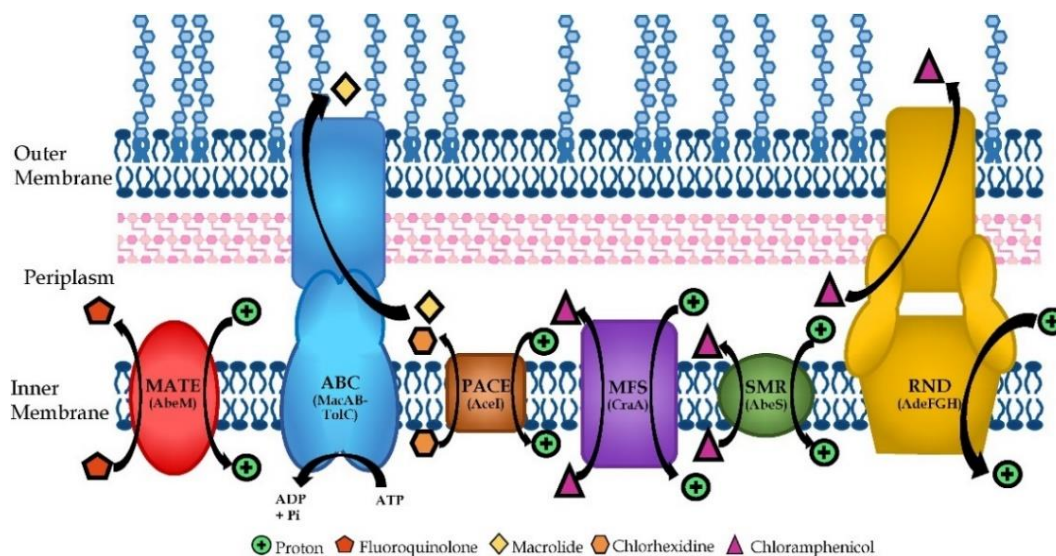


Figura 6. Esquema de las diferentes superfamilias de bombas de eflujo descritas en *A. baumannii*. MATE: *Multidrug And Toxic Compound Extrusion family*, ABC: *ATP-binding cassette superfamily*, PACE: *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux family*, MFS: *Major Facilitator Superfamily*, SMR: *Small Multidrug Resistance family* y RND: *Resistance-Nodulation Division family*. Los sustratos son ejemplos para ilustrar la dirección del transporte. Imagen obtenida de Kornelsen V *et al.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2021) (50).

4.3.1. MATE

Los transportadores de esta categoría transportan sustancias catiónicas utilizando un protón (H^+) o un ion de sodio (Na^+). Un ejemplo de este tipo de transportadores es AbeM, implicado en la disminución de la susceptibilidad a imipenem, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, trimetoprima, cloranfenicol, bromuro de etidio y tintes. Aunque existen tres transportadores de esta familia descritos en *A. baumannii*, solo se ha estudiado la implicación en la resistencia a antibióticos de AbeM, por lo que queda aún mucho por conocer de los transportadores MATE en esta especie (50).

4.3.2. ABC

Los transportadores incluidos dentro de esta familia emplean la energía producida por la hidrólisis del ATP para el transporte a través de la membrana. Los transportadores ABC se dividen a su vez en tres categorías

según su función: importadores, con funciones en la captación de nutrientes; exportadores, implicados en la secreción de algunas sustancias; y otros, con funciones en la traducción del ARNm y la reparación del ADN. Aunque se han descrito hasta 94 transportadores de esta familia en *A. baumannii* hasta la fecha, sus funciones y la implicación en la resistencia a antibióticos es aún desconocida. MacAB-TolC, es uno de estos transportadores que se han relacionado con la resistencia, principalmente a macrólidos, pero también a tigeciclina. Está compuesta por MacA y MacB, dos bombas transmembrana conectadas a TolC, una proteína de membrana externa. Esta bomba de eflujo está regulada por BaeSR (50).

4.3.3. PACE

Este grupo de bombas de eflujo se descubrió en *Acinetobacter* recientemente, y son responsables de la expulsión de biocidas como la clorhexidina, un antiséptico comúnmente utilizado tanto en el ambiente hospitalario como en productos de uso doméstico. La bomba de eflujo más conocida en *A. baumannii* es Acel, que está regulada por AceR, cuya expresión aumenta en presencia de clorhexidina. Otros miembros de la familia descritos en *Acinetobacter baumannii* pueden expulsar otro tipo de moléculas como acriflavina, un antiséptico de uso común (50).

4.3.4. MFS

Los transportadores de esta familia se dividen en tres categorías: simportadores, antiportadores y uniportadores. Los primeros transportan dos o más sustratos en la misma dirección y utilizan la energía producida por el gradiente de electrones de uno de ellos para hacerlo. Los del segundo grupo transportan dos o más sustratos en direcciones contrarias. Finalmente, los del tercer grupo transportan un único sustrato en dirección a su gradiente electroquímico. Aunque cada transportador es específico para un sustrato, el conjunto de todos ellos da como resultado una amplia gama de sustratos que pueden ser transportados. Los transportadores tipo MFS no han sido muy estudiados en las bacterias del género *Acinetobacter*, hasta la fecha se han

identificado 61 transportadores diferentes, sin embargo, no todos están implicados en la resistencia a antibióticos. Algunos ejemplos de transportadores implicados en la resistencia son: CmlA y CraA, dos transportadores implicados en la resistencia a cloranfenicol; AmvA, regulado por AmvR, es capaz de expulsar eritromicina y múltiples desinfectantes y tintes; AbaF, implicado en la resistencia a fosfomicina; AbaQ, implicado en el transporte de quinolonas; y por último los transportadores adquiridos tipo Tet, como TetA, implicados en la resistencia a tetraciclinas (50).

4.3.5. SMR

Aunque existen aproximadamente cuatro bombas de eflujo tipo SMR en *A. baumannii*, la única caracterizada es AbeS, implicada en cierta manera en la resistencia a cloranfenicol, fluoroquinolonas, eritromicina, novobiocina, detergentes y tintes. Muchos de los miembros de la familia SMR están implicados en la resistencia a compuestos de amonio cuaternario, utilizados como antisépticos o detergentes. Ejemplo de ello es la bomba de eflujo QacE, encontrada en un 40% de los aislamientos de *A. baumannii* y normalmente codificada en un integrón, que está implicada en la resistencia a clorhexidina, cloruro de benzalconio y ceftrimida (50).

4.3.6. RND

Estos transportadores están compuestos por una proteína de membrana externa, una proteína de membrana interna (RND) y una proteína adaptadora (*periplasmic adapter protein* [PAP] o *membrane fusion protein* [MFP]) que conecta ambas proteínas. Estas bombas de eflujo reconocen una amplia variedad de sustratos pertenecientes a prácticamente todas las clases de antibióticos, por ello, son las más clínicamente relevantes dentro de los patógenos gram-negativos (50). Las más importantes en *A. baumannii* son tres:

- **AdeABC:** fue la primera en caracterizarse y es la de mayor relevancia clínica, ya que está presente en un 80% de los aislamientos de *A.*

baumannii. Está codificada por el operón *adeABC*, y aunque es común encontrarlo sin el gen *adeC*, esto no parece afectar a su función ya que se cree que la función es sustituida por la proteína AdeK, parte de la bomba de eflujo constitutiva AdeIJK. La bomba de eflujo AdeABC es responsable de la expulsión de carbapenems, cefalosporinas, aminoglicósidos, trimetoprima, cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetraciclinas y bromuro de etidio (45, 50). Esta bomba está positivamente regulada por mutaciones o inserciones de *ISAb1* en el gen *adeS* del operón *adeRS*; o bien, por el sistema BaeSR y la densidad celular (50, 52).

- **AdeFGH:** se encuentra codificada por el operón *adeFGH*, regulado por AdeL, que está codificado inmediatamente antes del operón. Las mutaciones puntuales en esta región reguladora inducen la sobreexpresión de esta bomba de eflujo reduciendo la susceptibilidad a cloranfenicol, trimetoprima, sulfametoxazol, tetraciclinas, clindamicina, fluoroquinolonas y algunos tintes. Se ha descrito que la delección del operón *adeFGH* incrementa la expresión del operón *adeABC* (50, 52).
- **AdeIJK:** fue la segunda bomba de eflujo descrita en *A. baumannii*. Este transportador confiere resistencia a un amplio rango de sustratos como β -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, lincosamidas, rifampicina, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprima, novobiocina, ácido fusídico, safranina, pironina y SDS. Puede trabajar en conjunto con AdeABC en la expulsión de tetraciclinas. El operón *adeIJK* se expresa de forma constitutiva y rara vez se sobreexpresa, aunque sí puede ser reprimido por AdeN, cuyo gen se encuentra a una distancia de un cuarto de genoma del operón (50, 52).

4.4. Enzimas modificadoras de aminoglicósidos

Las enzimas modificadoras de aminoglicósidos son el principal mecanismo de resistencia a aminoglicósidos en *A. baumannii*. La modificación del antibiótico por estas enzimas anula la capacidad de este de unirse a la subunidad 30S del ribosoma y, por tanto, la bacteria puede

continuar con la síntesis de proteínas. Estas enzimas se diferencian en tres categorías: acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH). Ejemplos de estas enzimas son AAC(6')-Ib, ANT(2'')-Ia y APH(3')-Ia. Normalmente estas enzimas son muy específicas de sustrato, confiriendo resistencia a uno o dos antibióticos a lo sumo, sin embargo, se suelen combinar para producir fenotipos de alta resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina. Los genes más comúnmente encontrados en *A. baumannii* son *aadB* (42%) y *apa6* (26%), y es muy frecuente encontrarlos dentro de elementos genéticos móviles (1, 26, 45, 46, 53).

4.5. Modificaciones de diana

La modificación de las dianas de los diferentes antibióticos en *A. baumannii* puede producir resistencia a los antibióticos, sola o en combinación con otros mecanismos. Por ejemplo, en la resistencia a β -lactámicos, se pueden producir PBP modificadas que tienen una menor afinidad por estos antibióticos. Se han descrito siete PBP diferentes en *A. baumannii* (PBP1a, PBP1c, PBP2, PBP3, PBP4, PBP4b y PBP5). La resistencia a fluoroquinolonas también puede darse por mutaciones en los genes de la subunidad de la ADN girasa (*gyrA*) y de la topoisomerasa IV (*parC*) modificando los sitios de unión de estos antibióticos. De igual manera, en la resistencia a rifampicina, se producen mutaciones en la subunidad β de la ARN polimerasa (RpoB). En el caso de la resistencia a aminoglicósidos se producen alteraciones en la subunidad 16S del ribosoma, mediada por metiltransferasas del ARNr (ArmA y RmtB). En la resistencia a tetraciclinas, se pueden producir proteínas de protección ribosomal, como TetM, evitando que las tetraciclinas se puedan unir a él. También se han descrito mutaciones en los genes que codifican las enzimas dihidrofolato reductasa y dihidropteroato sintasa en la resistencia a trimetoprima (Dfr) y las sulfonamidas (Sul). Por último, las modificaciones en los lipopolisacáridos de la membrana externa, su pérdida completa o la adición de fosfoetanolamina

a estos por medio del sistema PmrABC, aumenta la resistencia a colistina en los aislamientos de *A. baumannii* (1, 26, 46).

5. Métodos de evaluación de la susceptibilidad a antibióticos

Evaluar la susceptibilidad a antibióticos es vital para ofrecer un tratamiento óptimo para los y las pacientes y evitar la diseminación de aislamientos resistentes por la exposición repetida a antibióticos de amplio espectro. Existen diferentes métodos para estudiar la susceptibilidad de los aislamientos bacterianos, a continuación, se detallan los más utilizados.

5.1. Método de difusión en disco

El método de difusión en disco o de Kirby-Bauer es un método estandarizado por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y el más utilizado. En dicho método se siembra en césped una placa de agar Mueller-Hinton con un inóculo a 0,5 McFarland ($1-1,5 \times 10^8$ UFC/mL) y se colocan encima discos que contienen concentraciones conocidas de antibióticos. El antibiótico difunde a lo largo del medio de cultivo e inhibe el crecimiento bacteriano creando un halo de inhibición, cuyo diámetro se mide para valorar la susceptibilidad respecto a los puntos de corte establecidos (54, 55).

5.2. Método de dilución en agar

Mediante este método podemos establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada antibiótico en los aislamientos estudiados. Se preparan placas de agar Mueller-Hinton de concentraciones ascendentes de antibiótico conocidas, y se inoculan gotas de varios aislamientos por placa. La CMI coincide con la concentración de antibiótico de la primera placa en la que no se observa crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos mediante esta técnica son más fiables y precisos que los obtenidos por el método de Kirby-Bauer.

5.3. Método de dilución en caldo

Esta técnica sigue el mismo principio que el método de dilución en agar, pero se emplea caldo Mueller-Hinton en lugar de agar. Se puede realizar en tubos o en microplacas de 96 pocillos, aunque la segunda opción es la más utilizada por la cantidad de pruebas que se pueden realizar rápidamente y por el ahorro de reactivos. Mediante este método también podemos establecer la CMI de cada antibiótico, que coincide con la concentración de antibiótico del primer tubo o pocillo en el que no se observa crecimiento (55, 56).

5.4. Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia

Debido al aumento de aislamientos resistentes en los últimos años, era necesario crear un consenso en la clasificación del nivel de resistencia de los organismos. Por ello, el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) y los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) crearon un comité de expertos que definió y estandarizó los baremos para evaluar el grado de resistencia. Estos se basaron en el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), EUCAST y la *Food and Drug Administration* (FDA) (57). Las categorías de antibióticos y el criterio utilizado para la definición de los aislamientos en MDR, XDR o PDR del género *Acinetobacter* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Clases de antibióticos utilizados para clasificar los aislamientos de *Acinetobacter* spp. en MDR, XDR y PDR (57).

Categoría antimicrobiana	Agente antimicrobiano
Aminoglicósidos	Gentamicina
	Tobramicina
	Amikacina
	Netilmicina
Carbapenems antipseudomonales	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem

Tabla 3. Continuación.

Fluoroquinolonas antipseudomonales	Ciprofloxacino Levofloxacino
Penicilinas antipseudomonales + inhibidores de β-lactamasas	Piperacilina/tazobactam Ticarcilina/ácido clavulánico
Cefalosporinas de espectro extendido	Cefotaxima Ceftriaxona Ceftazidima Cefepima
Inhibidores de la ruta del folato	Trimetoprima/sulfametoxazol
Penicilinas + inhibidores de β-lactamasas	Ampicilina/sulbactam
Polimixinas	Colistina Polimixina B
Tetraciclinas	Tetraciclina Doxiciclina Minociclina

Criterios para la definición de MDR, XDR y PDR en *Acinetobacter spp.*

Multirresistente (MDR): no susceptible a ≥ 1 agente en ≥ 3 categorías antimicrobianas

Con resistencia extendida (XDR): no susceptible a ≥ 1 agente en todas las categorías excepto ≤ 2

Panresistente (PDR): no susceptible a todos los antimicrobianos de la lista

6. Elementos genéticos móviles

Acinetobacter baumannii es un microorganismo con una gran plasticidad genómica, lo que significa que es capaz de adquirir y diseminar genes, especialmente de resistencia, con una gran facilidad. Estos mecanismos no serían posibles sin los elementos genéticos móviles: secuencias de inserción, transposones, integrones, islas genómicas de resistencia y plásmidos.

6.1. Secuencias de inserción y transposones

Las secuencias de inserción o *insertion sequences* (IS), también conocidos como transposones simples, tienen un tamaño aproximado de 1 Kb y son la unidad más pequeña dentro de los elementos móviles.

INTRODUCCIÓN

Únicamente llevan la información para su movilización, mediada por una transposasa codificada en uno o dos marcos abiertos de lectura u *open reading frames* (ORFs), cuya secuencia genética está flanqueada por dos repeticiones invertidas o *inverted repeats* (IR) y dos repeticiones directas o *direct repeats* (DR) que se generan en el momento de la transposición (Figura 7a). Las secuencias de inserción normalmente se nombran incluyendo las tres primeras letras de la especie en la que se descubrió, por eso, las IS en *A. baumannii* se denominan IS*Aba* (58, 59, 60).

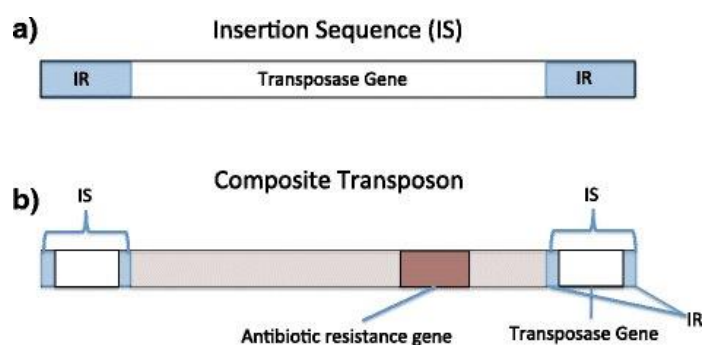


Figura 7. Estructura de los transposones simples (a) y compuestos (b). IR: *inverted repeats*. Imagen obtenida de Warnke-Sommer J *et al. BMC Genomics* (2016) (61).

Las IS tienen funciones clave en *A. baumannii*, ya que pueden aumentar la expresión de algunos genes de resistencia. Por ejemplo, la secuencia de inserción IS*Aba1*, identificada en un 94% de los aislamientos, se ha encontrado *upstream* de los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER} y *bla*_{ADC}. Otras secuencias de inserción descritas en *A. baumannii* *upstream* de los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58} son: IS*Aba2*, IS*Aba3* e IS*Aba4* (1, 59). Las IS también pueden insertarse en la región codificante de un gen para modificar su expresión como, por ejemplo, cuando IS*Aba1* se inserta en el gen *adeS* aumentando la expresión de la bomba de eflujo AdeABC (62). Y, por último, el mecanismo más importante mediado por las secuencias de inserción es la movilización de genes, que puede ser intracromosómica, de cromosoma a plásmidos, entre aislamientos de una misma especie, entre bacterias de otras especies e incluso entre bacterias de otros géneros.

Así pues, las IS pueden movilizar genes de resistencia como parte de un transposón simple, utilizando uno de los extremos de la IS que tenga cierta similitud con los alrededores donde se va a transponer. Pero también se pueden movilizar genes de resistencia como parte de un transposón compuesto que actúa movilizándose como una unidad. Este tipo de transposones está formado por un gen pasajero o *passenger gene* (normalmente un gen de resistencia), que se encuentra flanqueado a cada lado por una copia de una misma IS o una IS perteneciente a la misma familia (Figura 7b) (59). Algunos de los transposones más importantes responsables de la resistencia a carbapenems en *A. baumannii* son los transposones Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2008B y Tn2009. De ellos, el más frecuente es el Tn2006, seguido del Tn2009 y Tn2008. En el transposón Tn2006, el gen *bla_{OXA-23}* está flanqueado por dos copias de IS*Aba1* en direcciones opuestas. Los transposones Tn2007 y Tn2008/Tn2008B son transposones simples con una sola copia de IS*Aba4* o IS*Aba1* *upstream* del gen *bla_{OXA-23}*, respectivamente. Por último, el transposón Tn2009 contiene el gen *bla_{OXA-23}* flanqueado por dos IS*Aba1* en la misma orientación (Figura 8). Otro transposón importante en la resistencia a carbapenems, es el transposón Tn125, compuesto por un gen *bla_{NDM}* flanqueado a cada lado por una copia de IS*Aba125* (58, 59, 60).

Además de la movilización por medio de transposones, encontramos la movilización por el mecanismo *rolling-circle replication* o replicación de círculo rodante de la familia IS91 (ISCR1 e ISCR2) (60).

INTRODUCCIÓN

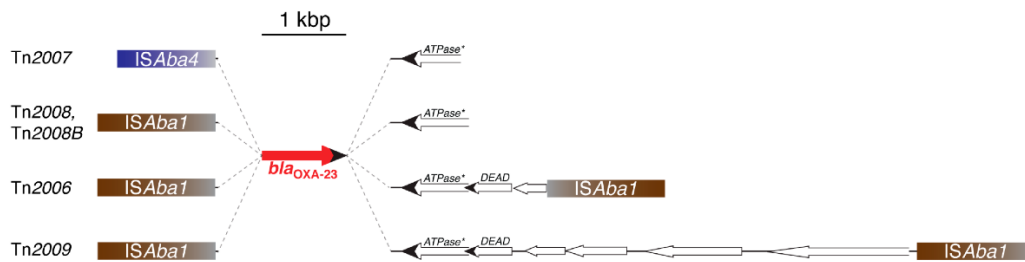


Figura 8. Estructuras genéticas de los transposones que contienen el gen *bla*_{OXA-23}. La orientación de *IS*_{Aba1} está representada en gradiente de color de más claro a más oscuro. ATPase*: gen que codifica para una ATPasa truncada; DEAD: *DEAD box family helicase*. Imagen obtenida de Ramirez MS *et al. Biomolecules* (2020) (48).

6.2. Integrones

Los integrones son parte del cromosoma de muchos aislamientos de *A. baumannii*, y se cree que estos elementos móviles contribuyen sustancialmente a la diseminación de la resistencia a los antibióticos (1). Los integrones son elementos genéticos capaces de acumular casetes genéticos (normalmente de genes de resistencia) independientes, que pueden estar en el cromosoma, en plásmidos o en transposones. Están compuestos por una región conservada que contiene tres elementos: sitio de integración o recombinación (*attI*), gen de integrasa (*intI*) y región del promotor (P1-P2); y una región variable donde se encuentran los casetes genéticos con los genes de resistencia. Aunque los integrones por sí solos no sean móviles, en conjunto con las secuencias de inserción y transposones, o por recombinación homologa pueden diseminar grandes casetes genéticos con múltiples genes de resistencia a otras partes del cromosoma, a plásmidos y finalmente a otros aislamientos (58, 59).

Los integrones se clasifican por la homología de sus integrasas en cinco categorías, sin embargo, los de clase 1 (*intI1*) son los más abundantes en *A. baumannii* y los de mayor relevancia clínica. Este tipo de integrones se han asociado con varias IS en *A. baumannii*: IS26, IS91, IS1999, IS2000 e IS6100. Cuando se asocian con elementos IS91-like, pueden formar ISCR (*Insertion Sequence Common Region*). Normalmente en los integrones de

clase 1 suelen acumularse genes de resistencia a aminoglicósidos, sulfonamidas y antisépticos, pero también genes de β -lactamasas como *bla_{PER}*, *bla_{GES}* y algunos *bla_{OXA}*. De hecho, la mayoría de genes de metalo- β -lactamasas en *A. baumannii* están normalmente localizados en integrones de clase 1 (59, 63).

Los integrones de clase 2 (*intl2*), en cambio, son muy poco frecuentes y se distribuyen mayoritariamente en países de Latinoamérica como Argentina, Brasil o Chile. Normalmente se encuentran dentro del transposón Tn7 y confieren resistencia a aminoglicósidos, trimetoprima, cloranfenicol, estreptomina y estreptotricina (59, 63).

6.3. Islas genómicas de resistencia

Las islas genómicas de resistencia son regiones con grandes agrupaciones de genes de resistencia a antibióticos y de resistencia a metales adquiridos por transferencia horizontal de genes. Estas regiones son lugares idóneos para la acumulación de elementos genéticos móviles, ya que la inserción en estas zonas no modifica genes que puedan afectar o dañar la célula bacteriana. La inserción de estas islas genómicas normalmente es llevada a cabo por genes que están asociados a IS, transposones y/o integrones (63).

La primera isla genómica de resistencia descrita en *A. baumannii* fue AbaR, cuya estructura de 86 Kb consiste en un transposón troncal (Tn6019), dos copias del transposón Tn6018 y una región MARR (*Multiple Antibiotic Resistance Region*) con 45 genes de resistencia. Estas estructuras normalmente se insertan en el gen *comM* del cromosoma, que codifica una proteína de función desconocida, sin embargo, también se han descrito en plásmidos (59, 60, 63). Otras islas importantes identificadas en *A. baumannii* son AbaR1, AbaR3, AbaR5, AbaR6, AbaR7, AbaR8, AbaR9 y AbaR10 (59, 60, 64).

6.4. Plásmidos

Los plásmidos son material genético extracromosómico circular de tamaño variable con un mecanismo de replicación propio, y que pueden transmitirse frecuentemente por conjugación a otras bacterias de la misma o de diferente especie. Además, pueden contener en su interior otros elementos genéticos móviles como integrones o transposones. Estas estructuras normalmente contienen genes de resistencia y virulencia, por ello, los plásmidos son una de las causas más importantes de la diseminación de la resistencia a antibióticos (59, 60).

Los plásmidos contienen genes para el mantenimiento propio (módulos de replicación, estabilidad y transferencia) y genes que no son imprescindibles para la célula pero que pueden proporcionarle cierta ventaja en condiciones ambientales adversas (módulo accesorio) (Figura 9). El módulo de estabilidad es responsable de la herencia estable de los plásmidos, que incluye sistemas de partición (*parA*, *parB*, *parC*) y sistemas toxina-antitoxina. El segundo sistema se basa en la estabilidad de ambos componentes, la antitoxina es menos estable que la toxina. Si la célula hija no recibe el plásmido, la antitoxina se degrada y la toxina mata a la célula, en cambio sí lo recibe, la antitoxina se une a la toxina y la neutraliza, evitando la muerte celular (65).

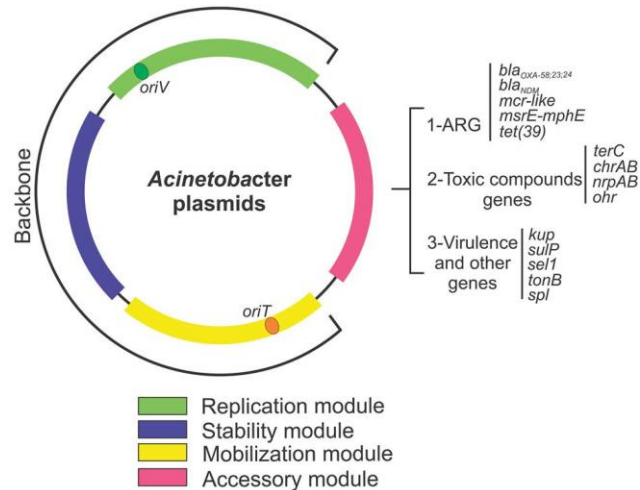


Figura 9. Estructura de los plásmidos en el género *Acinetobacter*. Dentro del módulo accesorio se indican los genes accesorios más comunes. No todas las regiones que forman el *backbone* o esqueleto tienen por qué estar presentes en todos los plásmidos. Imagen obtenida de Brovedan MA *et al.* *World Journal of Microbiology* (2020) (65).

Existen tres tipos de plásmidos: conjugativos, no transmisibles o movilizables. Los primeros se transmiten por un proceso llamado conjugación, por el cual dos bacterias, una donadora y una receptora, intercambian el contenido plasmídico por medio de un canal conector. Los plásmidos conjugativos contienen los siguientes elementos: un origen de transferencia (*oriT*), una proteína relaxasa (Tra o Mob) y las proteínas responsables del ensamblado del pili conjugativo (*type IV coupling protein* y *type IV secretion system*). Los plásmidos movilizables, en cambio, son aquellos que se transmiten por división celular a las células hijas o con la ayuda de elementos conjugativos.

En *Acinetobacter baumannii*, los genes de resistencia se encuentran localizados en plásmidos, principalmente. Aquellos plásmidos que codifican genes de resistencia a antibióticos normalmente tienen un control de su replicación muy estricto que limita el número de copias y su estabilidad en presencia de otros plásmidos. Aquellos plásmidos que tienen la misma proteína de iniciación de la replicación o replicasas (*replication initiator*

INTRODUCCIÓN

proteins [Rep]) no pueden coexistir en la misma célula, lo que se denomina incompatibilidad plasmídica (65).

Con el objetivo de establecer una clasificación de estas estructuras, se desarrolló un esquema basado en la detección de genes de replicasas (replicón) por PCR (*Acinetobacter baumannii* PCR-Based Replicon Typing [AB-PBRT]), que era capaz de detectar 27 genes de replicasas agrupados en 19 grupos de homología (GR1-GR19) (66). Sin embargo, desde su publicación se han descrito otros genes de replicasas que no se han podido clasificar por este método. En 2022, se propuso una mejora del método descrito por Bertini, creando una base de datos de 621 secuencias de plásmidos clasificadas en cuatro grupos en base a los genes de replicasas: Rep_1, RepPriCT_1, Rep_3 y un grupo sin genes *rep* identificables. Esta herramienta permite clasificar plásmidos comparando los genomas obtenidos por secuenciación masiva con los de la base de datos usando BLAST (67).

En *Acinetobacter spp.* los plásmidos pueden tener un tamaño desde 1,3 Kb hasta 400 Kb, aunque más de la mitad son de menos de 20 Kb (65). Los de mayor tamaño suelen codificar múltiples genes de resistencia y elementos móviles (65).

Los plásmidos de menos de 20 Kb suelen estar presentes en prácticamente todos los aislamientos del género *Acinetobacter*. La mayoría de estos plásmidos pertenecen al grupo de la superfamilia Rep_3 o a los plásmidos derivados de pRAY. Los pertenecientes al primer grupo contienen sistemas de partición, sistemas toxina-antitoxina tipo II, gen de relaxasa además de genes de virulencia (*TonB-dependent receptor* o septicolisina) y de resistencia a antibióticos (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-72} y *tet(39)*). Algunos de estos plásmidos también pueden codificar proteínas MobA y MobL, lo que les permitiría ser movilizables por otros plásmidos con capacidad de movilización propia. Aquellos plásmidos derivados de pRAY suelen tener un tamaño de aproximadamente 6 Kb y portan el gen *aadB*, que proporciona

resistencia a gentamicina, tobramicina y kanamicina; también contienen genes *mobA* y *mobC*. No se han identificado genes *rep* reconocibles en este tipo de plásmidos, por lo que no se han podido clasificar por el esquema basado en proteínas Rep. Además, existe un grupo de pequeños plásmidos de la superfamilia Rep_1 que son realmente curiosos, ya que codifican un gen *rep* y entre dos y cinco genes que codifican para proteínas hipotéticas sin aparente función (60, 65, 68).

Los plásmidos de más de 20 Kb no son tan frecuentes, y la mayoría pertenecen al grupo de homología GR6 siguiendo el esquema AB-PBRT. Los plásmidos de este grupo codifican genes de resistencia a aminoglicósidos y carbapenems como, por ejemplo, el gen *aphA6* (*aph(3')*-*Vla*) dentro del transposón *TnaphA6*; o el gen *bla_{OXA-23}* localizado dentro del transposón *Tn2006* y dentro de la isla genómica de resistencia *AbaR4*. Otros plásmidos grandes encontrados en *A. baumannii* en otras especies del género es el plásmido *pNDM-BJ01* y sus derivados, sin clasificación según el esquema AB-PBRT, que contienen el gen *bla_{NDM-1}* dentro del transposón *Tn125*, y también el gen *aphA6* y una *ISAba4 upstream* (59, 60, 65).

7. Epidemiología de *Acinetobacter baumannii*

7.1. Tipado molecular

El tipado molecular permite establecer relaciones entre aislamientos que pertenecen a una misma especie. Esto es importante, entre otras cosas, para saber si los casos de infección por una misma especie están relacionados o no entre sí, y si es así, establecer medidas de control para evitar brotes epidemiológicos. También para establecer características de virulencia comunes dentro de un mismo clon e identificar los clones circulantes. Los aislamientos se pueden tipar por diferentes métodos, sin embargo, no todos tienen la misma capacidad discriminatoria. Las técnicas

INTRODUCCIÓN

de tipado se centran principalmente en *A. baumannii*, ya que es la especie de mayor importancia clínica.

A lo largo de los años, se han empleado diferentes métodos de tipado fenotípicos y moleculares, sin embargo, el método de referencia para el tipado de *A. baumannii* continúa siendo la electroforesis de campo pulsado o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) debido a su alto poder discriminatorio. Este método consiste en la digestión del ADN total del aislamiento con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte (*ApaI*, *SmaI*) y su posterior separación mediante una electroforesis que va cambiando la dirección del campo eléctrico permitiendo la separación de fragmentos de hasta 1000 Kb. Como resultado, se producen patrones característicos de cada aislamiento que, en base al número de diferencias, se determina si están genéticamente relacionados y se establece su relación clonal (69). Sin embargo, la complejidad de la técnica y el tiempo necesario para la obtención de resultados, han provocado que nuevas técnicas cada vez más en auge la sustituyan en la rutina diaria de los laboratorios.

Otra de las técnicas más empleadas para el tipado durante las dos últimas décadas es el *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), que consiste en el análisis de las secuencias de siete genes constitutivos o *housekeeping*, que son genes muy conservados dentro de la especie. Cada alelo del gen tiene un número asignado, de manera que la combinación de los 7 números forma un perfil llamado *Sequence Type* (ST) que puede ser comparado con los ST descritos en la base de datos *PubMLST* (<https://pubmlst.org/organisms/Acinetobacter-baumannii>). Es una técnica muy empleada y de referencia para el estudio de estructuras poblacionales e investigaciones epidemiológicas (70). Se han desarrollado dos esquemas diferentes, Oxford y Pasteur, los cuales se diferencian por los genes analizados. El primero fue descrito por Bartual y colaboradores, incluyendo los genes *gltA* (*citrate synthase*), *gyrB* (*DNA gyrase subunit B*), *gdhB* (*glucose dehydrogenase B*), *recA* (*homologous recombination factor*), *cpn60* (*60-kDa*

chaperonin), *gpi* (*glucose-6-phosphate isomerase*) y *rpoD* (*RNA polymerase sigma factor*) (71). El segundo, en cambio, fue descrito por Diancourt y colaboradores e incluye los genes *cpn60* (*60-kDa chaperonin*), *fusA* (*elongation factor EF-G*), *gltA* (*citrate synthase*), *pyrG* (*CTP synthase*), *recA* (*homologous recombination factor*), *rplB* (*50S ribosomal protein L2*) y *rpoB* (*RNA polymerase subunit B*) (72). Se consideran parte de un mismo Complejo Clonal (CC) aquellos ST que comparten al menos cinco (*double locus variant*, DLV) o seis (*single locus variant*, SLV) de los siete alelos. Ambos esquemas son altamente reproducibles, poseen una gran resolución y existe una amplia base de datos disponible, aunque el esquema Pasteur es menos discriminatorio que el Oxford (69, 73). El esquema Oxford, por otro lado, presenta un problema, y es que es altamente frecuente la duplicación del gen *gdhB* dificultando la determinación del perfil alélico y su relación clonal (74, 75).

Recientemente se ha descrito una nueva técnica basada en la secuenciación masiva del genoma para el análisis de la epidemiología molecular de *A. baumannii*. Se basa en la comparación del genoma central o *core genome* (cgMLST), muy similar al MLST tradicional pero que involucra 2390 genes determinados a partir de la cepa de referencia *A. baumannii* ACICU (76). Al ser un método que estudia las diferencias genéticas de más del 50% del genoma de la especie, tiene una alto poder discriminatorio y resolución, muy útil en el estudio de la epidemiología a nivel tanto local como global (70).

7.2. Epidemiología a nivel mundial

La gran capacidad de supervivencia en el ambiente hospitalario y su facilidad para adquirir factores de virulencia y de resistencia, convierten a *A. baumannii* en un serio problema para el control de brotes epidemiológicos. El movimiento de pacientes infectados o personas colonizadas dentro de las instalaciones sanitarias, y el continuo movimiento poblacional a nivel local, nacional e internacional crean el entorno perfecto para la diseminación de

aislamientos resistentes. Los aislamientos de *A. baumannii* son clonales y se agrupan en clones internacionales o *International Clones* (IC). Los estudios epidemiológicos hasta la fecha han identificado un total de 11 clones internacionales (IC1-IC11), el último, identificado y propuesto recientemente en Dinamarca (77, 78).

Los clones más extendidos a nivel mundial son el IC1 y el IC2, identificados en todos los continentes. El clon IC3 parece no tener gran importancia actualmente, siendo su aparición esporádica en Estados Unidos, Sudáfrica o España. El clon IC5 es el más importante en Sudamérica, seguido del IC4, aunque también se han descrito aislamientos de estos clones en Europa y Asia. Los aislamientos del clon IC6 se aíslan principalmente en Europa del Este, Italia y Sudamérica. Los clones IC7 e IC10 se aíslan comúnmente en Europa, Asia y América. La mayor parte de aislamientos pertenecientes al clon IC8 son identificados en Europa, aunque de manera esporádica se describen aislamientos en países asiáticos. Por último, los aislamientos del clon IC9 se aíslan principalmente en los países de Oriente Medio y el Norte de África (79).

7.3. Epidemiología en Egipto y Oriente Medio

Debido a la ausencia de secuencias genómicas accesibles en bases de datos, es complicado conocer la situación y diseminación de los clones en los países de África y Oriente Medio (5, 80). Sin embargo, cada vez se realizan más estudios con técnicas de secuenciación masiva que permiten el seguimiento de los clones circulantes.

El clon más importante en Egipto y el causante de la mayoría de brotes es el IC2. En la última década, los aislamientos de *A. baumannii* que pertenecen al ST208 del esquema Oxford (IC2) han sido los más frecuentemente descritos en Egipto (81). Otros ST del clon IC2 relevantes son el ST281 y el ST195. Los aislamientos del clon IC2 suelen portar genes *bla*_{ADC}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{ADC} con *ISAba1 upstream* del gen y múltiples genes que

codifican enzimas modificadoras de aminoglicósidos (82). Además, es frecuente encontrar aislamientos del clon IC1 (ST231, ST441), IC5 (ST499, ST732) e IC9 (ST957, ST1078, ST1115, ST1580, ST2808). Menos frecuentemente se han descrito aislamientos de los clones IC4 (ST1115) e IC7 (ST2248). Los aislamientos del clon IC5 descritos portan muy comúnmente genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{GES-11} y *bla*_{ADC}; y los del IC4 genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{PER-7} (81, 82, 83).

En los países del Norte de África y Oriente Medio, los brotes suelen ser policlonales, aunque el clon IC2 es predominante. Estos aislamientos además suelen producir carbapenemasas NDM-1, NDM-2 y OXA-23 (80). Además del clon IC2, se describen frecuentemente aislamientos pertenecientes a los clones IC5 e IC9 (5, 84, 85). En Líbano, el linaje ST2 (IC2) es el más extendido y los aislamientos que pertenecen a él, frecuentemente portan el gen *bla*_{OXA-23}, que ha sustituido a los genes *bla*_{OXA-58} y *bla*_{OXA-24/40} por su mayor actividad carbapenemasa. También se han descrito aislamientos del ST2 portando el gen *bla*_{NDM-1} (86) y aislamientos ST6 (IC9) (69). En Sudan el IC2 es también el clon mayoritario, más concretamente, los ST2, ST570, ST600 y ST632 del esquema Pasteur (84). Aunque se han descrito aislamientos del ST85 (IC9) portando los genes de carbapenemasas *bla*_{OXA-94} y *bla*_{NDM-1}, ST1 (IC1) y ST602 (IC5) (84). Estudios recientes, describen aislamientos de los clones IC1 en Afganistán (ST81), IC2 (ST2) en Siria e IC7 (ST25) en Libia (87). Varios estudios en hospitales de Arabia Saudita, han evidenciado que la bacteria más aislada en las UCI es *A. baumannii* (40,9%), cuyos aislamientos pertenecen principalmente a los clones IC1 e IC2, y que en su mayoría portan una *ISAba1 upstream* de los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{IMP} (1, 88). En Pakistán, el clon más prevalente continúa siendo el IC2 (ST2) seguido del IC1 (ST1, ST589, ST7), y los aislamientos de este grupo habitualmente portan genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} y *bla*_{NDM-1}. También se han descrito ST de otros clones como el ST158 del clon IC7 en (89).

7.4. Epidemiología en el Área del Mediterráneo

Mientras que las tasas de aislamientos *A. baumannii* multirresistentes en el norte de Europa son considerablemente bajas (entre 0% y 6,1%), los países del Área del Mediterráneo son los países de Europa que habitualmente más aislamientos de *A. baumannii* multirresistentes identifican. Países como Croacia, Grecia, Chipre o Italia están a la cabeza con tasas de resistencia combinada (fluoroquinolonas, aminoglicósidos y carbapenems) de 98,5%, 91,4%, 88,8% y 84,7%, respectivamente (90).

Es habitual que los clones originados en un lugar concreto, se diseminen a otras áreas geográficas por medio de pacientes colonizados o infectados. Ejemplo de ello es el éxito del clon IC2/CC92 con el gen de carbapenemasa adquirido *bla*_{OXA-23}, cuya presencia es mundial (81, 84). Este clon también es el más importante en el Área del Mediterráneo, aunque se han descrito aislamientos pertenecientes al clon IC9, principalmente del ST85, el cual se ha descrito portando el gen *bla*_{NDM-1} en países mediterráneos como Francia, Túnez, Líbano y Turquía (84, 91); y portando el gen *bla*_{NDM-6} en España (92). Se cree que la presencia de estos clones en Europa se debe al movimiento de pacientes que viajan de Argelia, Túnez o Egipto portando estas nuevas variantes (78).



OBJETIVOS

OBJETIVOS

El Área del Mediterráneo es un punto caliente para la aparición de resistencias a los antibióticos, por lo que determinar las características de los aislamientos y de los genes circulantes es crítico para su control y para evitar la diseminación a otros países.

Es por ello, que este trabajo tuvo como objetivo principal la caracterización molecular y estudio de los mecanismos de resistencia de una serie de aislamientos clínicos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en hospitales de Alejandría, Egipto. Los objetivos parciales fueron los siguientes:

1. Identificar los aislamientos de *Acinetobacter spp.* a nivel de especie y determinar la susceptibilidad a los antibióticos normalmente utilizados para el tratamiento.
2. Caracterizar e identificar los genes de carbapenemasas y determinar su codificación genética en elementos genéticos móviles mediante técnicas de biología molecular.
3. Secuenciación masiva de los aislamientos con el objetivo de:
 - Estudiar su epidemiología molecular mediante la clasificación en clones internacionales y *sequence types*.
 - Caracterizar específicamente el viruloma y el resistoma
 - Estudiar el entorno genético y la localización de los genes de resistencia más importantes, y determinar específicamente la estructura de los plásmidos en los que se localizan.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Aislamientos bacterianos

Se estudiaron un total de treinta y seis aislamientos de *Acinetobacter baumannii* recogidos en el Laboratorio de Microbiología del *Medical Research Institute* de la *Alexandria University* (Alejandría, Egipto) entre agosto del año 2020 y febrero del 2021. Los aislamientos procedían de pacientes ingresados en diferentes hospitales de la ciudad de Alejandría, en Egipto. Un 60% de los aislamientos fueron obtenidos de *Mabaret El Asafra Hospital*, un 15% de la UCI del *Sahla Medical Center*, un 10% del *Alexandria University Main Hospital* y el resto de aislamientos se obtuvieron de las UCI de tres hospitales privados: *El Shefaa Hospital*, *El Amreya Medical Center* y *Badrawy Hospital*. Los datos de fecha de obtención, tipo de muestra y sexo de los y las pacientes se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de los aislamientos recogidos en los hospitales de Alejandría, Egipto entre agosto de 2020 y febrero de 2021. LBA= lavado broncoalveolar; H= hombre; M= mujer.

Aislamiento	Código hospital	Especie	Fecha aislamiento	Sexo	Muestra
Ale1	22020080178	<i>A. baumannii</i>	24/08/2020	H	LBA
Ale2	22020080156	<i>A. baumannii</i>	20/08/2020	H	Hisopo
Ale3	22020080187	<i>A. baumannii</i>	25/08/2020	M	MiniLBA
Ale4	22020080203	<i>A. baumannii</i>	27/08/2020	H	MiniLBA
Ale7	22020100027	<i>A. baumannii</i>	04/10/2020	H	Tubo endotraqueal
Ale8	22020100053	<i>A. baumannii</i>	06/10/2020	H	Hisopo
Ale9	22020100062	<i>A. baumannii</i>	08/10/2020	M	MiniLBA
Ale10	22020100070	<i>A. baumannii</i>	09/10/2020	M	Aspirado
Ale11	22020100071	<i>A. baumannii</i>	10/10/2020	M	Hisopo
Ale12	22020100073	<i>A. baumannii</i>	08/10/2020	H	Sangre
Ale13	22020100104	<i>A. baumannii</i>	14/10/2020	H	Aspirado

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4. Continuación.

Aislamiento	Código hospital	Especie	Fecha aislamiento	Sexo	Muestra
Ale14	22020100105	<i>A. baumannii</i>	15/10/2020	H	MiniLBA
Ale15	22020100184	<i>A. baumannii</i>	28/10/2020	M	MiniLBA
Ale16	22020110070	<i>A. baumannii</i>	10/11/2020	H	MiniLBA
Ale17	22020110061	<i>A. baumannii</i>	09/11/2020	H	MiniLBA
Ale18	22020110048	<i>A. baumannii</i>	05/11/2020	M	Orina
Ale19	22020110071	<i>A. baumannii</i>	10/11/2020	H	Aspirado
Ale20	22020110085	<i>A. baumannii</i>	12/11/2020	H	Espujo
Ale21	22020110084	<i>A. baumannii</i>	12/11/2020	M	Hisopo
Ale22	2020060104	<i>A. baumannii</i>	21/06/2020	M	Sangre
Ale23	22020110154	<i>A. baumannii</i>	22/11/2020	H	Tejido
Ale24	22020110202	<i>A. baumannii</i>	28/11/2020	M	Hisopo
Ale25	22020110203	<i>A. baumannii</i>	29/11/2020	M	Hisopo
Ale26	22020120004	<i>A. baumannii</i>	01/12/2020	M	MiniLBA
Ale27	220201200058	<i>A. baumannii</i>	06/12/2020	M	Hisopo
Ale28	22020120076	<i>A. baumannii</i>	07/12/2020	H	MiniLBA
Ale29	22020120092	<i>A. baumannii</i>	11/12/2020	H	Espujo
Ale30	22020120091	<i>A. baumannii</i>	11/12/2020	H	MiniLBA
Ale31	22020120174	<i>A. baumannii</i>	25/12/2020	H	MiniLBA
Ale32	22020120189	<i>A. baumannii</i>	28/12/2020	H	MiniLBA
Ale33	22021010009	<i>A. baumannii</i>	01/01/2021	M	Hisopo
Ale34	22021010016	<i>A. baumannii</i>	02/01/2021	H	Sangre
Ale35	22021010200	<i>A. baumannii</i>	-	M	Sangre
Ale36	22021010711	<i>A. baumannii</i>	28/01/2021	H	Sangre
Ale37	22021020055	<i>A. baumannii</i>	07/02/2021	M	Espujo
Ale38	22021020060	<i>A. baumannii</i>	08/02/2021	H	LBA

2. Cepas de referencia

Como cepas control para las diferentes técnicas utilizadas se incluyeron las siguientes:

- Identificación a nivel de especie: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
- Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Identificación de genes de β -lactamasas: *A. baumannii* MC1 (*bla*_{OXA-23}) y *A. baumannii* AbBAS-1 (*bla*_{NDM})
- Evaluación de la producción de *biofilm*: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Escherichia coli* J53
- Experimentos de motilidad: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978
- Controles de pesos moleculares para las extracciones de plásmidos: *Escherichia coli* NCTC 50193 (CECT 678) y *Escherichia coli* NCTC 50192 (CECT 679)
- Secuenciación masiva del genoma: *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978

3. Medios de cultivo y de conservación

- Agar Mueller-Hinton (*Scharlau*, Ref: 01-136-500): Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada: peptona 17,5; sólidos de infusión de carne 2; almidón 1,5; agar 17. pH final a 25°C: 7,3 \pm 0,1.

Método de preparación: añadir 38 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar durante 10 minutos. Llevar a ebullición hasta disolución completa y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Caldo Mueller-Hinton (*Scharlau*, Ref: 02-136-500): Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada: peptona 17,5; sólidos de infusión de carne 2; almidón 1,5. pH final a 25°C: $7,3 \pm 0,1$.

Método de preparación: añadir 21 g del polvo en 1 L de agua destilada y agitar durante 10 minutos hasta su total disolución y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

- Agar MacConkey (*Scharlau*, Ref: 01-118-500): Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada: digerido pancreático de gelatina 17; peptona de carne 1,5; peptona de caseína 1,5; lactosa monohidrato 10; sales biliares 1,5; cloruro sódico 5; rojo neutro 0,03; cristal violeta 0,001; agar 15. pH final a 25°C: $7,1 \pm 0,2$.

Método de preparación: añadir 51,5 g del polvo en 1 L de agua destilada, llevar a ebullición hasta disolución completa y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

- *Motility Test Medium* (*Condalab*, Ref: 2116.00): Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada: agar bacteriológico 5; triptosa 10; cloruro de sodio 5. pH final a 25°C: $7,2 \pm 0,2$.

Método de preparación: añadir 20 g del polvo en 1 L de agua destilada, calentar en agitación y llevar a ebullición durante 1 minuto hasta su disolución completa y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

- CHROMagar *Acinetobacter* (*CHROMagar*TM, Ref: AC092): Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada: agar 15; peptona y extracto de levadura 12; sales 4; mezcla cromogénica 1,8. Suplemento: factores de regulación y crecimiento 4mL/L. pH final a 25°C: $7 \pm 0,2$.

Método de preparación: añadir 32,8 g del polvo en 1 L de agua destilada, añadir 4 mL del suplemento a la mezcla y llevar a ebullición en agitación hasta su disolución completa. No sobrepasar los 100°C y no autoclavar.

- Medio de conservación: añadir 500 µL de caldo Mueller Hinton y 500 µL glicerol en tubos eppendorf y autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

4. Materiales y reactivos

- Glicerol anhidro de grado molecular (*Scharlau*, Ref: GL00281000)
- Agua libre de nucleasas (no tratada con DEPC) (*Thermo Fisher Scientific*, Ref: AM9939)
- *TaKaRa Taq™ HS Perfect Mix* (*Takara Bio INC.*, Ref: R300A)
- 10x TBE (*Tris/Boric Acid/EDTA*) Buffer, 5 L (*Bio-Rad*, Ref: #1610770)
- *Agarose D1 low EEO* (*Condalab*, Ref: 8010.00)
- *GelRed® Nucleic Acid Stain (10,000X, Water)* (*Biotium, Inc.*, #SCT123)
- *NZYDNA Ladder V* (*NZYTech*, Ref: MB06101)
- *DNeasy Blood and Tissue Kit* (*Qiagen*, Ref: 69504)
- *MiSeq Reagent Kit v3* (*Illumina Inc.*, Ref: MS-102-3001)
- Microplaca de 96 pocillos de fondo plano *Nunclon™* (*Thermo Fisher Scientific*, Ref: 167008)
- Cloruro de sodio (*Scharlau*, Ref: SO02301000)
- Discos cefiderocol 30µg (*Thermo Fisher Scientific*, Ref: CT1964B)
- Tiras ETEST® de Piperacilina/Tazobactam (*bioMérieux*, Ref: 421166)
- Tiras ETEST® de Ticarcilina/Ácido clavulánico (*bioMérieux*, Ref: 412473)

MATERIALES Y MÉTODOS

- Placa de cultivo de 24 pocillos de fondo plano (*Sarstedt*®, Ref: 0000833922)
- Solución cristal violeta 2,3% (*Sigma Aldrich*, Ref: HT90132-1L)
- GENEJET *Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Ref: K0502)
- GENEJET *Plasmid Midiprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Ref: K0481)
- Etanol absoluto EssentQ® (*Scharlau*, Ref: ET0002005P)
- Agarosa LM de bajo punto de fusión (*Condalab*, Ref: 8050)
- Lisozima ~70000 U/mg (*Sigma Aldrich*, Ref: 62971-10G-F)
- Proteínasa K 100 mg (*Macherey-Nagel*, Ref: 740506)
- Filtro jeringuilla estéril 25mm 0,22µm (*Scharlau*, Ref: PES252250S)
- Jeringa Braun injekt luer 20 mL (*Scharlau*, Ref: 004606205V)
- Ácido acético glacial 100% (*Sigma Aldrich*, Ref: K24551963)
- SeaKem® *Gold Agarose* (*Lonza*, Ref: 50150)
- *CHEF DNA Size Standard*, 48.5–1,000 kb, *Lambda Ladder* (*Bio-Rad*, Ref: #1703635)
- *MiSeq Reagent Kit v3* (*Illumina Inc.*, Ref: MS-102-3003)
- *Flow Cell R9* (*Oxford Nanopore Technologies*, Ref: FLO-MIN106)
- *Rapid Barcoding Kit 24 V14* (*Oxford Nanopore Technologies*, Ref: SQK-RBK004)
- Papeles de celulosa para cromatografía Whatman® (*Sigma Aldrich*, Ref: WHA3030-909)

- *DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (Roche, Ref: 11218603910)*
- *TaKaRa Taq™ DNA Polymerase 250 Units (Takara Bio INC., Ref: # R001A)*
- *Conjunto de dNTP, soluciones de 100 mM (Thermo Fisher Scientific, Ref: R0181)*
- *Digoxigenina-11-dUTP, estable a los álcalis (Roche, Ref: 11558706910)*
- *Acetato sódico anhidro EMSURE® (Sigma Aldrich, Ref: 1062680250)*
- *Ácido maleico Emprove® Essential (Sigma Aldrich, Ref: 8170581000)*
- *EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) (Bio-Rad, Ref: #1610729)*
- *Tris-base (Scharlau, Ref: TR04231000)*
- *Tri-Sodium citrato dihidrato (Merck, Ref: 1.06448.1000)*
- *Ácido clorhídrico 37%, Pharmapur® (Scharlau, Ref: AC07361000)*
- *Sodio hidróxido, Pharmapur® (Scharlau, Ref: SO04201000)*
- *Formamida EssentQ® (Scharlau, Ref: FO00251000)*
- *Resina de intercambio iónico AG 501-X8 (D) (Bio-Rad, Ref: #142-6425)*
- *Desoxicolato de sodio monohidrato 98% (Alfa Aesar, Ref: 205-652-1)*
- *N-lauroil-sarcosina sal de sodio (Sigma Aldrich, Ref: L5777-50G)*
- *SDS (Dodecilsulfato sódico) (Bio-Rad, Ref: #1610301)*
- *Brij 35 (Merck, Ref: 8.01962.0250)*
- *Membranas de Nylon cargadas positivamente (Roche, Ref: 11209299001)*

MATERIALES Y MÉTODOS

- Membranas de Nylon cargadas positivamente BrightStar™ (*Thermo Fisher Scientific*, Ref: AM10100)
- Solución de ADN de esperma de salmón UltraPure™ (*Thermo Fisher Scientific*, Ref: 15632011)
- *DIG Nucleic Acid Detection Kit* (*Roche*, Ref: 11175041910)
- *Kit KAPA2G Fast HostStart Readymix PCR* (*KAPABIOSYSTEMS*, Ref: KR0376_S v2.17)
- *InstaGene Matrix* (*Bio-Rad*, Ref: 732-6030)
- *Diamond DNA Ladder 100-3000bp* (*Rockland Immunochemicals*, Ref: MB-203-0500)

5. Soluciones stock

- Acetato sódico 3M pH 5,2: Disolver 24,61 g de acetato sódico en agua destilada. Ajustar el pH con ácido acético glacial y ajustar con agua destilada estéril hasta un volumen de 1L. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Tris-HCl 1M pH 7,5/ pH 8: Pesar 60,55 g de Tris-base en 400 mL de agua destilada estéril y ajustar el pH con ácido clorhídrico 37% hasta alcanzar el pH deseado. Ajustar hasta 500 mL con agua destilada estéril.
- EDTA 0,5M pH 8/ pH 9: Disolver 36,52 g de EDTA en 200 mL de agua destilada estéril y ajustar el pH con NaOH y completar hasta 250 mL con agua destilada estéril. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- TE pH 8: Mezclar 10 mL de Tris-HCl 1M pH 8, 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8 y agua destilada estéril hasta 1 L. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

- NaCl 5M: Pesar 292,2 g de cloruro de sodio y disolver en 1L de agua destilada. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- SSC 20X: Disolver 175,3 g NaCl y 88,2 g de citrato sódico en agua destilada. Ajustar el volumen hasta 1 L con agua destilada y autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- HCl 0,25 M: Diluir 10,42 mL de HCl 37% en 489,58 mL de agua destilada.
- NaOH 1N: Pesar 40 g de hidróxido de sodio y disolver en 1 L de agua destilada.
- Solución desnaturalizante: Mezclar 150 mL de NaCl 5M y 250 mL de NaOH 1N y ajustar hasta 500 mL con agua destilada estéril.
- Solución neutralizante: Mezclar 250 mL de Tris-HCl 1M y 150 mL de NaCl 5M y ajustar con agua destilada estéril hasta 500 mL.
- Formamida desionizada: Mezclar 10 mL de formamida con 5-10 g de resina de intercambio iónico. Mezclar durante 30 minutos, filtrar con papel Whatman 3MM y conservar a -20°C.
- Tampón de ácido maleico: Pesar 11,6 g de ácido maleico, añadir 30 mL de NaCl 5M y agua destilada hasta 1 L. Ajustar el pH a 7,5.
- Solución de bloqueo 10X: Añadir 10g de reactivo de bloqueo incluido en el kit DIG *Nucleic Acid Detection Kit* en 100 mL de tampón de ácido maleico. Preparar en agitación y calentando en el microondas. Se conserva a -20°C y se diluye a 1X al momento de su uso.
- N-lauroil-sarcosina 10%: Disolver 5 g de N-lauroil-sarcosina sal de sodio en 40 mL de agua destilada estéril y ajustar hasta 50 mL. Esterilizar por filtración.
- SDS 10%: Disolver 5 g de dodecilsulfato sódico en 40 mL de agua destilada estéril y ajustar hasta 50 mL.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Solución de hibridación: Para preparar 500 mL de solución combinar 250 mL de formamida desionizada, 125 mL de SSC 20X, 50 mL de solución de bloqueo 10X, 5 mL de N-lauroil-sarcosina 10% y 1 mL de SDS 10% (Conc. Finales: formamida desionizada 50%; SSC 5X; solución de bloqueo 2%; N-lauroil-sarcosina 0,1%; SDS 0,02%). A la cantidad necesaria de esta solución que se va a utilizar en el protocolo se le añade, en el momento de su utilización, 100 µg de ADN de esperma de salmón recién desnaturalizado a 100°C durante 10 minutos.
- TBS pH 7,5: Mezclar 25 mL de Tris-HCl 1M y 15 mL de NaCl 5M y ajustar hasta 500 mL con agua destilada estéril.
- Solución cromática: Mezclar 50 mL de Tris-HCl 1M pH 9,5 y 10 mL de NaCl 5M y ajustar con agua destilada estéril hasta 500 mL. Preparar al momento de usar en un recipiente cubierto con papel de aluminio ya que no le puede dar la luz. Añadir 100 µL de reactivo 4 del kit *DIG Nucleic Acid Detection Kit* (NBT y BCIP) a 5 mL de solución cromática justo antes de su uso.
- Desoxicolato sódico 10%: Disolver 5,1 g de desoxicolato sódico en 40 mL de agua destilada estéril. Ajustar el volumen hasta 50 mL y esterilizar por filtración.
- N-lauroil-sarcosina 20%: Disolver 10 g de N-lauroil-sarcosina en 40 mL de agua destilada estéril. Ajustar el volumen hasta 50 mL y esterilizar por filtración.
- Brij 35 5%: Disolver 2,5 g de Brij 35 en 40 mL de agua destilada estéril. Ajustar el volumen hasta 50 mL y esterilizar por filtración.
- Lisozima 50 mg/mL: Disolver 1 g de lisozima en 20 mL de agua destilada estéril. Dispensar en alícuotas de 500 µL.
- Proteinasa K 20 mg/mL: Añadir 5 mL de agua destilada estéril a los 100 mg de proteinasa K contenidos en el bote. Dispensar en alícuotas de 500 µL.

- Etanol 70%: Mezclar 70 mL de etanol absoluto con 30 mL de agua destilada.

6. Primers

Tabla 5. Primers empleados para la identificación por PCR de las especies del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* mediante la amplificación diferenciada del gen *gyrB*.

Especie	Secuencia
<i>A. calcoaceticus</i>	F (D14): 5'-GAC AAC AGT TAT AAG GTT TCA GGT G-3' R (D19): 5'-CCG CTA TCT GTA TCC GCA GTA-3'
<i>A. pittii</i>	F (D16): 5'-GAT AAC AGC TAT AAA GTT TCA GGT GGT-3' R (D8): 5'-CAA AAA CGT ACA GTT GTA CCA CTG C-3'
<i>A. baumannii</i>	F (Sp2F): 5'-GTT CCT GAT CCG AAA TTC TCG-3' R (Sp4R): 5'-AAC GGA GCT TGT CAG GGT TA-3'
<i>A. baumannii</i> y <i>A. nosocomialis</i>	F (Sp4F): 5'-CAC GCC GTA AGA GTG CAT TA-3' R (Sp4R): 5'-AAC GGA GCT TGT CAG GGT TA-3'

Tabla 6. Primers empleados para la identificación por PCR de los genes de carbenemasas tipo *bla_{OXA}* característicos en *A. baumannii*.

Gen	Secuencia
<i>bla_{OXA}-23-like</i>	F: 5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3' R: 5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'
<i>bla_{OXA}-24/40-like</i>	F: 5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3' R: 5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'
<i>bla_{OXA}-51-like</i>	F: 5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3' R: 5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'
<i>bla_{OXA}-58-like</i>	F: 5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3' R: 5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'
<i>bla_{OXA}-143-like</i>	F: 5'-AGT TAA CTT TCA ATA ATT G-3' R: 5'-TTG GAA AAT TAT ATA ATC CC-3'
<i>bla_{OXA}-235-like</i>	F: 5'- TTG TTG CCT TTA CTT AGT TGC -3' R: 5'-CAA AAT TTT AAG ACG GAT CG -3'

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 7. *Primers* empleados para la identificación por multiplex-PCR de otros genes de carbapenemasas tipo OXA, secuencias de inserción tipo IS*Aba1* asociadas al gen *bla*_{OXA-51} y metalo- β -lactamasas.

Gen	Secuencia
<i>bla</i> _{VIM-like}	F (J18): 5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT ATC-3' R (J43): 5'-CGT CAT GAA AGT GCG TGG AG-3'
<i>bla</i> _{KPC-like}	F (J19): 5'-CGC CAA TTT GTT GCT GAA GG-3' R (J20): 5'-CAG GTT CCG GTT TTG TCT CC-3'
<i>bla</i> _{NDM-like}	F (J23): 5'-GTT TGA TCG TCA GGG ATG GC-3' R (J24): 5'-CTC ATC ACG ATC ATG CTG GC-3'
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	F (J25): 5'-GGT AGC AAA GGA ATG GCA AGA A-3' R (J26): 5'-CGA CCC ACC AGC CAA TCT TA-3'
<i>bla</i> _{IMI-like}	F (J31): 5'-AGA CTC GAT CGT TGG GAG TT-3' R (J32): 5'-TCG CTT GGT ACG CTA GCA CG-3'
<i>bla</i> _{GES-like}	F (J35): 5'-CTC AGA TCG GTG TTG CGA TC-3' R (J36): 5'-TGT ATC TCT GAG GTC GCC AG-3'
<i>bla</i> _{GIM-like}	F (J37): 5'-TTA TCC TGG GCG ACT GAC AG-3' R (J38): 5'-CAG CGG TCG GTT GCA TTA AT-3'
<i>bla</i> _{IMP-like}	F (K31): 5'-GAA GGC GTT TAT GTT CAT AC-3' R (K32): 5'-GTA CGT TTC AAG AGT GAT GC-3'
IS <i>Aba1-bla</i> _{OXA-51-like}	F (K38): 5'-TGT GGT AAG CAC TTG ATG GG-3' R (K39): 5'-ATT GCC ATA ACC AAC ACG CT-3'

Tabla 8. *Primers* empleados para la elaboración de sondas de ADN marcadas con digoxigenina.

Gen	Secuencia
<i>bla</i> _{NDM}	F seq: 5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT ATC-3' R seq: 5'-CGT CAT GAA AGT GCG TGG AG-3'
<i>bla</i> _{GES}	F: 5'- ATGCGCTTCATTACGCAC -3' R: 5'- CTATTTGTCCGTGCTCAGGA -3'
<i>bla</i> _{PER}	F: 5'-CCT GAC GAT CTG GAA CCT TT-3' R: 5'-GCA ACC TGC GCA ATG ATA GC-3'

7. Equipamiento

- Armario refrigerado (*LIEBHERR*)
- Congelador vertical (*LIEBHERR*)
- Congelador vertical (*Ignis*)
- Dispensador remoto de agua purificada E-POD® (*Milli-Q*)
- Balanza FX-200 (*SALTER*)
- pH-metro de precisión (*BANTE Instruments*)
- Autoclave Presoclave III 50L (*Selecta*)
- Estufa de cultivo bacteriológico (*Selecta*)
- Cabina de flujo laminar FASTER TWO-30 (*Cultair*)
- Centrífuga 2-16P (*Sartorius*)
- Microcentrífuga C1301-LT (*Labnet*)
- *Thermoleader Dry Block Heat Bath* (*Uniequip*)
- Densitómetro McFarland DEN-1B (*Grant Bio*)
- Baño con agitación (*Shel lab*)
- Plataforma giratoria (*Heidolph*)
- Selladora (*SilverCrest*)
- Horno de hibridación 20 L con agitador SI20H (*Stuart Scientific*)
- Transiluminador (*Vilber Lourmat*)

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cámara de electroforesis *Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad)*
- Fuente de energía *Powerpac Basic 300V (Bio-Rad)*
- *GelDoc™ EZ Imager (Bio-Rad)*
- *GelDoc™ EZ UV Sample Tray (Bio-Rad)*
- *Molecular Imager® Gel Doc™ XR System*
- *CHEF-DR® III Variable Angle System (Bio-Rad)*
- *CHEF Electrophoresis Cell (Bio-Rad)*
- *CHEF Cooling Module, 220/240 V (Bio-Rad)*
- *VITEK®2 (bioMérieux)*
- Termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)*
- *Illumina MiSeq System (Illumina Inc.)*
- *MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies)*

MÉTODOS

1. Identificación a nivel de especie

1.1. Sistemas semi-automáticos

Se utilizó el sistema VITEK®2 (*bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia*) en el *Medical Research Institute* de la *Alexandria University* para la identificación a nivel de especie de los aislamientos.

1.2. Multiplex PCR para genes *gyrB*

Las diferencias en la secuencia del gen *gyrB*, gen muy conservado dentro del género *Acinetobacter*, se pueden emplear para diferenciar entre las especies *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus* mediante multiplex PCR siguiendo el protocolo descrito previamente (20).

1. Para ello, se preparó un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL con 100 μ L de agua de grado molecular libre de nucleasas y con un asa de siembra se inocularon 1-2 colonias del aislamiento. Se homogenizó con la pipeta y se llevó a ebullición a 100°C durante 15 minutos en el termobloque.
2. El hervido se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm y el sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf estéril.
3. A continuación, se prepararon las reacciones de PCR dentro de la cabina de bioseguridad en hielo en tubos de PCR de 200 μ L. Para un volumen final de 50 μ L de reacción se añadieron las siguientes cantidades de reactivo:
 - 25 μ L de *TaKaRa Taq™ HS Perfect Mix*
 - 10 μ L de *primer mix* (a una concentración de *primers* de 1 μ M)
 - 10 μ L agua de grado molecular libre de nucleasas
 - 5 μ L de hervido

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- Desnaturalización a 94°C durante 2 minutos
 - 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto
 - Extensión final a 72°C por 10 minutos
4. Las reacciones resultantes junto con el marcador de peso molecular NZYDNA *Ladder V* se corrieron en un gel de agarosa al 1% (al que se

le había añadido previo a su solidificación el tinte de ácidos nucleicos GelRed® en TBE 1X a 75V. Transcurrido el tiempo se fotografió el gel en el lector de geles GelDoc™ EZ *Imager* utilizando para ello la bandeja GelDoc™ EZ UV *Sample Tray* y el programa *Image Lab*.

1.3. Detección mediante PCR del gen *bla*_{OXA-51}, intrínseco en *A. baumannii*

Para confirmar que los aislamientos pertenecían a la especie *A. baumannii* también se investigó la presencia del gen *bla*_{OXA-51-like} siguiendo el protocolo previamente descrito (21).

1. La extracción del ADN de los aislamientos y la preparación de la reacción se realizó igual que se ha descrito en el apartado 1.2 de métodos.
2. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:
 - Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos
 - 30 ciclos de 94°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos y 72°C por 50 segundos
 - Extensión final a 72°C por 6 minutos
3. Las reacciones resultantes se visualizaron del mismo modo que en el apartado 1.2 de métodos.

1.4. Secuenciación masiva del genoma

Los aislamientos también fueron identificados taxonómicamente por secuenciación masiva del genoma mediante la tecnología Illumina.

1. Primero se purificó el ADN total de los aislamientos de *A. baumannii* utilizando el kit *DNeasy Blood and Tissue* y se secuenció con el aparato *Illumina MiSeq* utilizando el *MiSeq Reagent Kit v3* en modo lecturas pareadas (2 × 300) (93).

2. Las lecturas crudas del secuenciador se analizaron directamente con el *pipeline* bioinformático TORMES® (94) y se utilizó *A. baumannii* ATCC 17978 como cepa de referencia. El control de calidad y el filtrado de las lecturas se hicieron con las herramientas Trimmomatic (95), Prinseq (96) y Kraken (97). El ensamblado de los genomas se realizó con SPAdes (98) y Quast (99) y se utilizó el *software* Prokka (100) para la anotación del genoma.
3. La herramienta Kraken 2 (101) y el análisis de los genes 16S del ARN ribosómico con RDP Classifier (102) permitieron la identificación a nivel de especie de los aislamientos.

2. Determinación de susceptibilidad a antibióticos

2.1. Sistemas semi-automáticos

Para la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los aislamientos a nivel hospitalario se empleó el sistema semi-automático VITEK®2. Se evaluaron los siguientes antibióticos: ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulánico, piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem, amikacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacino, minociclina, colistina y trimetoprima/sulfametoxazol.

2.2. Método de microdilución en caldo

Para complementar los resultados obtenidos por VITEK®2 se utilizó el método de microdilución en caldo en microplacas para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria siguiendo el protocolo previamente descrito por EUCAST (103).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Primero, se cogieron de 3 a 5 colonias de la placa de cultivo de cada aislamiento y se sembraron en tubos de 5 mL de caldo Mueller Hinton y se dejaron incubando a 37°C de 2 a 6 horas hasta alcanzar una turbidez de 0,5 MacFarland. En aquellos cultivos en los que la turbidez superó los 0,5 MacFarland, se realizó el ajuste con suero fisiológico estéril (0,85 g NaCl/100 mL).
2. En las microplacas se añadieron 50 µL de caldo Mueller Hinton en todos los pocillos y se realizaron las diluciones seriadas de los antibióticos añadiendo 50 µL del antibiótico en el primer pocillo a una concentración de 512 mg/L y trasladando 50 µL al pocillo siguiente hasta completar la fila. Se descartaron 50 µL del último pocillo de la dilución para que el volumen fuera de 50 µL en todos los pocillos. Además, la última columna se empleó como control positivo, por lo que no se añadió antibiótico y únicamente había caldo con cultivo.
3. A continuación, se añadieron 50 µL de cultivo en todos los pocillos, exceptuando aquellos que se utilizaron como control negativo (solo caldo Mueller Hinton).
4. Se incubaron las placas a 37°C durante 20 horas y se determinó la CMI como la menor concentración de antibiótico en la que ya no se observó crecimiento bacteriano.

2.3. Método de Kirby-Bauer (disco-placa)

La susceptibilidad a cefiderocol se determinó por el método disco-placa de Kirby-Bauer con discos de 30µg de cefiderocol siguiendo las indicaciones y puntos de corte de EUCAST (Versiones 10.0 y 12.0, enero 2022).

1. La preparación del inóculo se realizó igual que en el apartado 2.2 de métodos.

2. A continuación, se introdujo un hisopo estéril en el tubo de cultivo ajustado y se realizó una siembra en césped en placas de agar Mueller Hinton, colocando posteriormente con pinzas presionando levemente el disco de cefiderocol sobre la placa.
3. Se incubaron las placas a 37°C durante 20 horas y se determinó la susceptibilidad midiendo los halos de inhibición alrededor del disco y comparándolos con los puntos de corte establecidos.

2.4. Método del Épsilon test

Se empleó este método para la determinación de las CMI de aquellos aislamientos que no podían ser testados de manera específica por VITEK®2, como, por ejemplo, para las combinaciones de antibióticos e inhibidores ticarcilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam dada su dificultad para conseguir dichas combinaciones en polvo valorado para microdilución.

1. La preparación del inóculo y la preparación de la placa con la tira de antibiótico/inhibidor se realizó igual que en el apartado 2.3 de métodos.
2. Se incubaron las placas a 37°C durante 20 horas y se determinó la CMI en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test. Si el crecimiento tenía lugar a lo largo de toda la tira y no se observaba formación de la elipse de inhibición, la CMI se determinaba como superior al valor máximo de la tira.

3. Identificación de genes de resistencia a los antibióticos

3.1. Detección de genes de carbapenemasas *bla*_{OXA} y metalo-β-lactamasas por multiplex PCR

Se llevó a cabo una multiplex PCR para la detección de los genes de oxacilinasas *bla*_{OXA}-23-like, *bla*_{OXA}-24/40-like, *bla*_{OXA}-51-like, *bla*_{OXA}-58-like, *bla*_{OXA}-143-like

y *bla*_{OXA-235-like} siguiendo el protocolo descrito en la literatura (104, 105, 106). La presencia de otras carbapenemasas se detectó utilizando dos multiplex PCR previamente descritas, con ligeras modificaciones (107): en estas reacciones no se incluyeron los *primers* para los genes *bla*_{OXA} que ya se incluían en la PCR anterior. Así pues, dichas reacciones incluían *primers* para los siguientes genes: *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMI}, *bla*_{GES}, *bla*_{GIM}, *bla*_{IMP} e *ISAbA-1/bla*_{OXA-51-like}.

1. La extracción de ADN de los aislamientos y la preparación de la reacción se realizó igual que se ha descrito en el apartado 1.2 de métodos.
2. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Multiplex PCR oxacilinasas

- Desnaturalización a 94°C durante 5 minutos
- 30 ciclos de 94°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos y 72°C por 50 segundos
- Extensión final a 72°C por 6 minutos

Multiplex PCR carbapenemasas

- Desnaturalización a 94°C por 3 minutos
 - 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 15 segundos y 72°C por 1 minuto
 - Extensión final a 72°C por 5 minutos
3. Las reacciones resultantes se visualizaron del mismo modo que en el apartado 1.2 de métodos.

3.2. Identificación del resistoma mediante secuenciación masiva del genoma

Los genomas ensamblados de todos los aislamientos se utilizaron para analizar el resistoma mediante la herramienta online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (108) y ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>) contra las bases de datos ResFinder (109), CARD (110) y ARG-ANNOT (111). También se utilizó la base de datos online *Beta Lactamase Database* (BLDB) (47) para la comprobación de las variantes de los genes de β -lactamasas. Estas herramientas identifican los genes de resistencia y sus variantes comparando los genomas analizados con las secuencias de la base de datos.

3.3. Análisis del entorno genético de los genes de betalactamasas

Los *contigs* que contenían los genes de betalactamasas *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{PER-7}, *bla*_{GES-35}, *bla*_{GES-11}, *bla*_{ADC-like} y *bla*_{TEM-like} se visualizaron y editaron con SnapGene Viewer 6.0.5 (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>) en busca de elementos genéticos móviles.

4. Identificación y estudio de los factores de virulencia

4.1. Identificación del viruloma mediante secuenciación masiva del genoma

El viruloma se analizó comparando los genomas resultantes de la secuenciación con los genes de virulencia de la base de datos *Virulence Factors Database* (VFDB) (112).

4.2. Experimentos de formación de *biofilm*

La estimación cuantitativa de la formación de *biofilm* se realizó en placas estériles de 24 pocillos de fondo plano Sarstedt® por el método de O'Toole y Kolter (113) con algunas modificaciones. La cuantificación de *biofilm* se realizó por triplicado en tres días diferentes.

1. Se preparó un cultivo de los aislamientos en caldo Mueller Hinton partiendo de las colonias en placa y se dejó crecer toda la noche en agitación a 37°C.
2. Al día siguiente se midió la turbidez en el densitómetro y se ajustaron los cultivos a 0,5 McFarland.
3. En las placas de 24 pocillos se añadieron 900 µL de caldo Mueller Hinton y 100 µL de los cultivos ajustados en cada pocillo.
4. Las placas se dejaron creciendo en la estufa sin agitación durante toda la noche a 37°C.
5. Al día siguiente, se descartó cuidadosamente el medio de cultivo de todos los pocillos con una pipeta y se lavaron dos veces con 1 mL de agua destilada por pocillo. Antes de continuar, se sacó toda el agua remanente de los pocillos y se dejaron secar las placas durante 20 minutos.
6. A continuación, se procedió a la tinción del *biofilm* añadiendo 1 mL de cristal violeta al 0.7% en cada pocillo y se dejó durante 12 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se retiró el cristal violeta con una pipeta y se lavaron de nuevo los pocillos dos veces con 1 ml de agua destilada por pocillo y se dejaron secar las placas al aire durante 20 minutos.

7. Para solubilizar el cristal violeta adherido a los pocillos, se añadió 1 mL de ácido acético al 33% a cada pocillo y se pusieron las placas en agitación durante 5 minutos.
8. Por último, para tener una medida cuantitativa de la producción, se tomaron muestras de 100 μ L de cada pocillo y se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo plano para proceder a su lectura en un lector de placas a una densidad óptica de 600 nm. La cantidad de colorante es proporcional a la densidad del *biofilm*.

4.3. Experimentos de motilidad

Los ensayos de motilidad fueron llevados a cabo en placas Petri con el medio de motilidad de Condalab.

1. Se preparó un cultivo de los aislamientos en caldo Mueller Hinton partiendo de las colonias en placa y se dejó crecer toda la noche en agitación a 37°C.
2. Al día siguiente se ajustaron los cultivos a 0,5 McFarland.
3. Las placas fueron inoculadas con 1 μ L de cada aislamiento en la superficie en el centro e incubadas durante 72 horas. Transcurrido el tiempo se observaron y compararon con las cepas control para evaluar su motilidad.

5. Tipado molecular y estudio de la epidemiología molecular mediante secuenciación masiva del genoma

5.1. Asignación de cada aislamiento a un Clon Internacional mediante la determinación de la variante del gen *bla*_{OXA-51}

Se ha evidenciado que algunas variantes del gen *bla*_{OXA-51-like} están relacionadas con los clones internacionales descritos hasta ahora. En consecuencia, se combinaron la variante de *bla*_{OXA-51} y los resultados de *Multi Locus Sequence Typing* para asignar a cada aislamiento a un clon internacional.

5.2. *Multi Locus Sequence Typing* (MLST)

Los aislamientos se tiparon siguiendo los esquemas Pasteur y Oxford de MLST a partir de los genomas obtenidos de la secuenciación masiva del genoma. Para ello, se utilizó la herramienta online de MLST de T. Seemann, (<https://github.com/tseemann/mlst>).

5.3. *Core genome Multi Locus Sequence Typing* (cgMLST)

Con el objetivo de estudiar la relación clonal de los aislamientos, se llevó a cabo el MLST del *core genome* o genoma central compuesto por 2390 alelos utilizando los genomas completos de los aislamientos y el software Ridom SeqSphere+ versión 8.5.1 (*Ridom GmbH*, Münster, Alemania). Para visualizar las relaciones clonales entre aislamientos se emplearon arboles de expansión mínima o *minimum spanning trees*.

6. Análisis plasmídico

6.1. Extracción de plásmidos mediante kit comercial

Se realizaron extracciones de plásmidos de todos los aislamientos utilizando el kit comercial de plásmidos GeneJET *Plasmid Miniprep Kit* siguiendo las indicaciones de la casa comercial con alguna modificación.

1. Se sembraron de 2 a 3 colonias de cada aislamiento en tubos con caldo Mueller Hinton y se dejaron crecer en agitación hasta el día siguiente.
2. Al día siguiente se centrifugaron los cultivos a 8000 rpm en la microcentrífuga durante 2 minutos y se quitó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta que se centrifugaron la totalidad de los cultivos y se obtuvo suficiente pellet. Dada la naturaleza clínica de los aislamientos, se realizaron dos lavados extra con suero salino para limpiar el posible *biofilm* y así facilitar la lisis.
3. A continuación, se resuspendieron los pellets de los aislamientos en 250 μ L de la solución de resuspensión y se agitaron con el vórtex para evitar aglomerados.
4. Se añadieron 250 μ L de la solución de lisis a cada tubo y se invirtieron los tubos de 4 a 6 veces hasta que las soluciones se volvieron viscosas y algo claras.
5. El siguiente paso consistió en añadir 350 μ L de la solución de neutralización y mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces.
6. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 12000 rpm y se transfirieron los sobrenadantes a las columnas GeneJET. Las columnas se centrifugaron durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante.

7. A continuación, se procedió a lavar las columnas mediante la adición de 500 μL de la solución de lavado, centrifugación a 12000 rpm durante 60 segundos y descarte del sobrenadante. Este paso se repitió dos veces. Para eliminar posibles residuos de la solución de lavado, que contiene etanol, se centrifugó la columna vacía durante 1 minuto a 12000 rpm.
8. Por último, se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se añadieron 50 μL de tampón de elución previamente calentado a 70°C para mejorar la recuperación de plásmidos de >20 Kb. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos. Se repitió este último paso con 15 μL de tampón de elución para aumentar en un 10-20% la recuperación de plásmidos.

6.2. S1-Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Para la detección de plásmidos de alto peso molecular, se llevó a cabo una electroforesis de campo pulsado o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* con la endonucleasa S1, que permite linealizar plásmidos.

1. Primero se sembraron los aislamientos en agar Mueller Hinton y se incubaron las placas a 37°C durante 16-20 horas. Para asegurar la pureza de los cultivos, se subcultivó una colonia de cada aislamiento en CHROMagar *Acinetobacter* durante 16-20 horas más.
2. Al día siguiente, se resuspendieron las bacterias en 2,5 mL de TE hasta alcanzar una densidad de 3 MacFarland y se transfirieron 500 μL a un tubo eppendorf que se introdujo en el baño a 50°C.
3. En un matraz se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 2% en buffer TE y se introdujo en el baño a 50°C para igualar la temperatura de los aislamientos y de la agarosa. Mientras tanto, se prepararon los moldes para los bloques sellándolos con cinta de autoclave.

4. A continuación, se mezclaron 500 μ L de agarosa y 500 μ L de las suspensiones de los aislamientos, homogeneizando bien con la pipeta y llenando los moldes de manera que quedaran un poco rebosantes y dejando un pocillo libre entre aislamientos. Se dejaron solidificar en la nevera durante al menos 15 minutos. Mientras, se preparó la solución de lisis GP (1 ml por cepa + 1) como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición de la solución de lisis GP para la elaboración de datos empleados en PFGE.

Soluciones stock	Volumen para 1 mL	Concentración final
Tris-HCl 1 M (pH 8)	6 μ L	6 mM
NaCl 5 M	200 μ L	1 M
EDTA 0.5 M (pH 8)	200 μ L	100 mM
Desoxicolato-Na 10%	20 μ L	0,2%
Sarcosil 20%	25 μ L	0,5%
Brij 35 5%	100 μ L	0,5%
Lisozima 50 mg/ml	10 μ L	0,5 mg/mL
Agua destilada estéril	439 μ L	

5. Se dispensó 1 mL de la solución de lisis en tubos eppendorf, y una vez que los bloques solidificaron, se extrajeron de los moldes empujando con la microespátula y se transfirieron 2 bloques por aislamiento a cada tubo. Los tubos se incubaron en la estufa a 37°C en agitación durante toda la noche.
6. Al día siguiente se preparó la solución GN (1 ml por cepa + 1) como se indica en la Tabla 10.

Tabla 10. Modo de preparación de la solución GN para la elaboración de los datos empleados en PFGE.

Soluciones stock	Volumen para 1 mL	Concentración final
Proteinasa K 20 mg/ml	25 μ L	0,5 mg/mL
Agua destilada estéril	975 μ L	

MATERIALES Y MÉTODOS

7. Se retiró la solución anterior de los tubos y se añadió 1 mL de solución GN y se incubaron los tubos en el baño a 56°C hasta el día siguiente.
8. Al día siguiente, primero se puso el baño a 50°C con una botella con TE durante todo el proceso de lavado y se pasaron los bloques a tubos de fondo cónico con 6 mL de TE y se pusieron en el baño en agitación a 50°C.
9. Cada 30 minutos se aspiraba el TE y se volvía a reponer. Se hicieron un total de 8 lavados para eliminar posibles restos de los productos empleados para la lisis celular. Los bloques se almacenaron en tubos eppendorf con TE en la nevera.
10. A continuación, se cortaron los bloques del tamaño del pocillo para la electroforesis y se equilibraron los bloques con 100 µL de Tris-HCl 10 mM durante 15 minutos dos veces.
11. Para digerir el ADN con S1, se preparó una solución de S1 a una concentración de 0,14 U/µL y se sumergieron los bloques en 100 µL de la solución, de manera que cada bloque tuviera 14 U de enzima. La reacción se incubó durante 15 minutos a 37°C en el termobloque.
12. Transcurrido ese tiempo, se sustituyó la solución de S1 por TE y se dejaron los bloques durante 1 hora en la solución.
13. A continuación, se cargaron los bloques en el gel de agarosa al 1%, se sellaron los pocillos con agarosa a 50°C y se corrió la electroforesis de campo pulsado en TBE 0,5X con las siguientes condiciones detalladas en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones para la puesta en marcha de la electroforesis PFGE.

Rango de pulsos	5-35 segundos
Tiempo	17 horas
Voltaje	6 V/cm
Ángulo	120°
Temperatura	14°C

14. Transcurrido el tiempo, se tiñó el gel con GelRed® 3X diluido en TBE 0,5X durante 30 minutos y se visualizó el resultado en el lector de geles.

6.3. Tipado de replicones en *A. baumannii* mediante PCR

Se realizaron multiplex PCR para la identificación de los genes de replicasas descritos previamente (66). Este método permite identificar mediante 6 multiplex un total de 27 genes de replicasas agrupados en 19 grupos de homología según la similitud de sus secuencias.

1. La extracción del ADN de los aislamientos se hizo utilizando la resina InstaGene™ *Matrix* siguiendo el protocolo de la casa comercial. Y las reacciones de PCR se prepararon con el kit KAPA2G *Fast HotStart Readymix* PCR siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Los tubos se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones de PCR:
 - Desnaturalización a 95°C durante 3 minutos
 - 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos
 - Extensión final a 72°C por 1 minuto
3. Las reacciones resultantes junto con el marcador de peso molecular *Diamond DNA Ladder* se corrieron en un gel de agarosa al 1% (al que

se le había añadido previo a su solidificación el tinte de ácidos nucleicos GelRed®) en TBE 0,5X a 100 V. Transcurrido el tiempo se fotografió el gel en el lector de geles *Molecular Imager® Gel Doc™ XR System* con la opción Gel Doc XR y el programa Quantity One v4.6.9.

6.4. Secuenciación y resolución de plásmidos por MinION y ensamblaje híbrido

Se seleccionaron siete aislamientos con las diferentes combinaciones de genes de replicasas encontrados (Ale9, Ale10, Ale18, Ale20, Ale21, Ale25 y Ale26) para la secuenciación de los plásmidos. Las secuencias genómicas fueron generadas combinando los datos de secuenciación de Illumina y MinION con Unicycler v0.5.0 (<https://github.com/rrwick/Unicycler>).

1. El ADN total se purificó utilizando el kit *DNeasy Blood and Tissue* siguiendo las instrucciones del producto.
2. A continuación, se prepararon las librerías y la *flow cell* utilizando el kit *Rapid Barcoding 24 V14* como indica la casa comercial, y se secuenció durante 24 horas con el sistema MinION Mk1C de *Oxford Nanopore Technologies*.
3. Tras la secuenciación, las lecturas del secuenciador fueron identificadas por los códigos de barras y se asignaron bases nucleicas a los picos del cromatograma mediante *Guppy v.6.5.7+ca6d6af* (114) y *Minimap2 v.2.24-r112* (115) en el modo *super-quality*.
4. A continuación, se realizaron controles de calidad y filtrado de las lecturas de menos de 250 pb o de calidad menor al Q10 con *NanoPack v.1.4.1* (116). También se comprobaron posibles contaminaciones con el programa *Kraken v.2.1.2 8* (101).
5. Las lecturas fueron ensambladas y pulidas utilizando *Flye v2.9.2-b1786* (117) y *Medaka v.1.7.2*

(<https://github.com/nanoporetech/medaka>), respectivamente. Se comprobó el ensamblado visualmente con Bandage (118) y se comprobó la calidad del ensamblado con Quast v.5.2.0 (99).

6. Las secuencias ensambladas fueron anotadas con Bakta v.1.7.0 (119) y los genes de resistencia a antimicrobianos se buscaron mediante el uso de Abricate v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) en las siguientes bases de datos: NCBI-AMRFinderPlus (120), CARD (121), ResFinder (109) y ARG-ANNOT (111).
7. Por último, se detectaron los plásmidos y se clasificaron utilizando MOBsuite 3.0.3 (122) y *Copla.py* v.1.0 (123). También se identificaron los genes de replicasas a partir de las secuencias plasmídicas obtenidas utilizando BLAST y la base de datos *Acinetobacter Plasmid Typing* (67).
8. Para crear los mapas de plásmidos se utilizó la herramienta online Proksee.ca (124).

7. Determinación de la localización genética de los genes de resistencia a antibióticos *bla*_{NDM-1}, *bla*_{PER-7} y *bla*_{GES-like} mediante *Southern blot* e hibridación con sondas de ADN marcadas con digoxigenina

Tanto los geles de electroforesis de las extracciones de plásmidos como los geles de la electroforesis de campo pulsado con endonucleasa S1 fueron transferidos por el método *Southern blot* y sometidos a hibridación con sondas de ADN de los genes de interés marcadas con digoxigenina.

7.1. Elaboración de las sondas de ADN

1. Primero se preparó una solución al 10X con las siguientes concentraciones de nucleótidos (dNTP *mix*):

MATERIALES Y MÉTODOS

- 2 mM dATP, dCTP y dGTP
 - 0,7 mM DIG-11-dUTP
 - 1,3 mM dTTP
2. El resto de los componentes de la PCR se añadieron de la forma habitual. Como ADN molde se utilizó ADN del aislamiento que sabíamos que tenía el gen para el cual se quería hacer la sonda y se utilizaron los *primers* correspondientes a cada gen. Para una reacción de PCR de un volumen final de 50 μ L la reacción fue la siguiente:
- 0,25 μ L de *Taq* polimerasa
 - 5 μ L de DNA molde
 - 0,5 μ L de *primer* F
 - 0,5 μ L de *primer* R
 - 5 μ L 10x *Taq* PCR buffer
 - 5 μ L dNTP mix
 - 33,75 μ L agua destilada de grado molecular
3. El amplificado se purificó añadiéndole 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol helado y dejándolo precipitar durante toda la noche a -20°C. Luego, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos y se resuspendió en 50 μ L de TE pH 8.
4. Para comprobar si había sonda y en qué cantidad, se cortó un trozo de filtro de nylon y se humedeció en SSC 2X, para a continuación aplicar diluciones seriadas de la sonda y de un control marcado con digoxigenina de concentración conocida incluido en el kit *DIG Nucleic Acid Detection Kit*. Se dejó secar el filtro y se fijó 2 minutos con UV en el transiluminador.
5. Una vez fijado, se incubó el filtro durante 30 minutos en 20 mL de solución de bloqueo 1X.

6. Se lavó el filtro durante 10 minutos con 50 mL de TBS en tres ocasiones.
7. Mientras se hacían los lavados, se centrifugó el anticuerpo anti-digoxigenina durante 5 minutos a 10000 rpm y se diluyó a 1:5000 en 20 mL de solución de bloqueo al 1X. El filtro se incubó con esta solución durante 1 hora.
8. A continuación, se lavó el filtro durante 10 minutos con 50mL de TBS en 3 ocasiones. Se añadieron 5 mL de solución cromática y se incubó hasta el día siguiente tapado con papel de aluminio para protegerlo de la luz.
9. Cuando se produjo la reacción, se lavó el filtro con agua destilada durante 5 minutos y se procedió a estimar la concentración de la sonda. Para ello, se comparó la intensidad de señal de la sonda con la intensidad del control proporcionado en el kit comercial.

7.2. Southern blot

1. Los geles de agarosa de electroforesis convencional y de campo pulsado se recortaron en el transiluminador y se colocaron en una bandeja de cristal para sumergirlos en una solución de HCl 0,25 M durante 15 minutos.
2. A continuación, se desnaturalizó el ADN de los geles sumergiéndolos en diferentes volúmenes de solución desnaturalizante durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Este paso se hizo dos veces.
3. El proceso de desnaturalización se paró sumergiendo los geles en diferentes volúmenes de solución neutralizante durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Este paso se hizo dos veces.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Para la transferencia se cubrió un soporte con papel Whatman 3MM y se colocó este soporte dentro de una bandeja. El soporte debe ser más ancho y más largo que el gel. Se añadió un volumen de 10X SSC humedeciendo el papel Whatman 3MM que cubre el soporte y de manera que la parte inferior del mismo quedara bien cubierta. Es importante eliminar todas las burbujas que haya entre el soporte y el papel Whatman 3MM.
5. Antes de colocar el gel en el soporte, se colocó un borde de Parafilm de manera que el gel encajara en el recuadro un poco por encima de los bordes.
6. Se colocó el gel sobre el papel Whatman asegurando que no hubiera burbujas entre el papel y el gel.
7. A continuación, se cortó un filtro de nylon que fuera 2 mm más largo que el gel en ambas dimensiones y se sumergió en 2X SSC durante 3 minutos.
8. Una vez humedecido el filtro, se colocó sobre el gel teniendo en cuenta que un borde estuviera sobre la línea de pocillos del gel y evitando que hubiera burbujas entre el gel y el filtro.
9. Para evitar el contacto entre el filtro y las toallitas de papel absorbente, se humedecieron 3 trozos de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel en 2X SSC y se colocaron sobre el filtro evitando burbujas.
10. Por último, se colocó una torre de toallitas de papel absorbente de unos 8 cm sobre el papel Whatman 3MM y se puso un peso de 500 g encima. El montaje se dejó aproximadamente 24 horas y se fueron cambiando las toallitas absorbentes según se iban humedeciendo.
11. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el filtro y se sumergió en 6X SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos y se dejó secar sobre

papel Whatman 3MM. Cuando el filtro estuvo seco se sometió a radiación UV durante 2 minutos por el lado del DNA.

7.3. Hibridación con sondas de ADN

1. Primero se introdujo el filtro de nylon en una bolsa de hibridación con 3 mL de solución de hibridación (sin sonda) procurando que no se produjeran burbujas al sellarla y se incubó durante 1 hora a 42°C.
2. Transcurrido el tiempo, se añadieron 3 mL de solución de hibridación con 10-15 ng de sonda marcada por cada ml de solución evitando que se produjeran burbujas. Se incubó hasta el día siguiente a 42°C en agitación.
3. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó el filtro a temperatura ambiente 15 minutos dos veces con 50 mL de solución de SSC 2X y SDS 0,1% (p/v). Y posteriormente, se hicieron otros 2 lavados de 30 minutos a 68°C con 50 mL de una solución de 0,1X SSC y SDS 0,1% (p/v).
4. Una vez lavado, se llevó a cabo el revelado del filtro como se ha descrito a partir del paso 5 de la elaboración de sondas de ADN.
5. Cuando se produjo la reacción, se lavó el filtro con agua destilada durante 5 minutos y se fotografió el filtro húmedo. Se dejó secar el filtro sobre papel Whatman 3MM y se almacenó plastificado.



RESULTADOS

RESULTADOS

1. Identificación de los aislamientos estudiados a nivel de especie

En este estudio hemos encontrado que los treinta y seis aislamientos recogidos entre agosto del año 2020 y febrero del año 2021 en hospitales de Alejandría en Egipto, fueron identificados como *Acinetobacter baumannii* por VITEK® 2, multiplex PCR del gen *gyrB* y detección del gen intrínseco *bla_{OXA-51}* por PCR (Figura 13), siendo posteriormente confirmado por secuenciación masiva.

Mediante la técnica multiplex PCR del gen *gyrB* se obtuvieron dos amplicones de 490 y 294 bp correspondientes al perfil *gyrB* de *A. baumannii* (Figura 10).

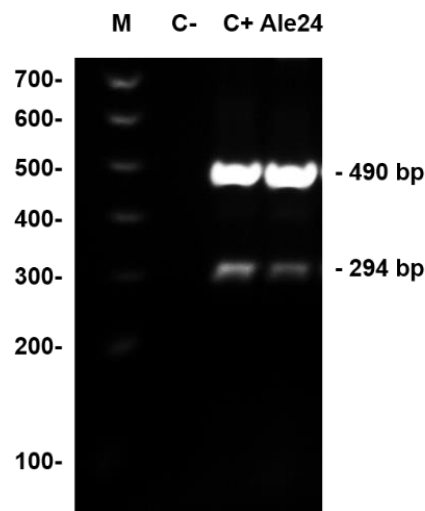


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la técnica multiplex PCR del gen *gyrB* de los aislamientos de Alejandría. Carril 1: marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V; carril 2: control negativo; carril 3: control positivo; y carril 4: aislamiento *A. baumannii* Ale24.

2. Características de las muestras estudiadas

La distribución por sexo de los treinta y seis aislamientos fue de veintiún aislados de pacientes hombres (58%) y quince de pacientes mujeres (42%). Los aislamientos se obtuvieron de diferentes tipos de muestra: lavado broncoalveolar (n=14, 39%), hisopo (n=8, 22%), sangre (n=5, 14%), aspirado (n=3, 8%), esputo (n=3, 8%), tubo endotraqueal (n=1, 3%), orina (n=1, 3%) y tejido (n=1, 3%) (Figura 11).

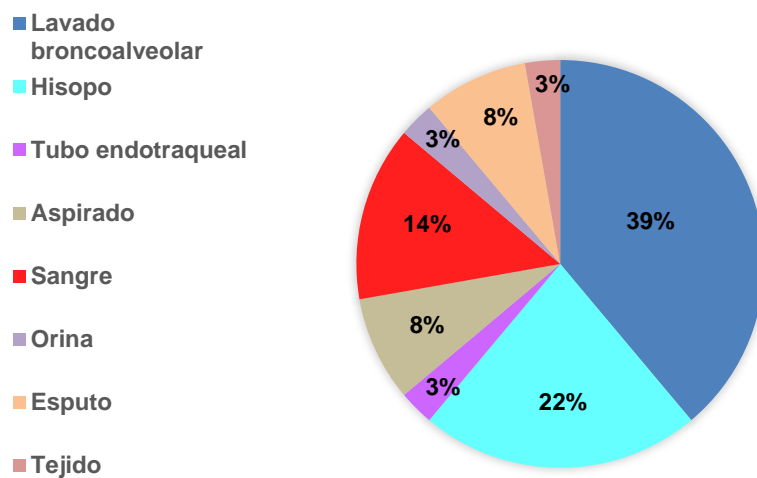


Figura 11. Porcentajes de los diferentes tipos de muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislamientos de *A. baumannii* estudiados.

3. Susceptibilidad a antibióticos

Veintiocho aislamientos (77,78%) cumplían los criterios para ser incluidos dentro de la categoría de resistencia extendida (XDR) y ocho aislamientos (22,2%) entraban en la categoría de multirresistentes (MDR).

Como se observa en la Figura 12, la resistencia a los antibióticos del grupo de los carbapenems fue importante, con casi un 95% de los aislamientos resistentes a imipenem y a meropenem. Además, el 100% de

los aislamientos mostraron resistencia a ciprofloxacino, antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas. Las tasas de resistencia a aminoglicósidos variaron entre el 77 y el 94% dependiendo del antibiótico. Cabe destacar que el 22% de aislamientos fueron resistentes a cefiderocol. Todos los aislamientos fueron susceptibles a colistina. Las concentraciones mínimas inhibitorias se muestran en la Tabla 12.

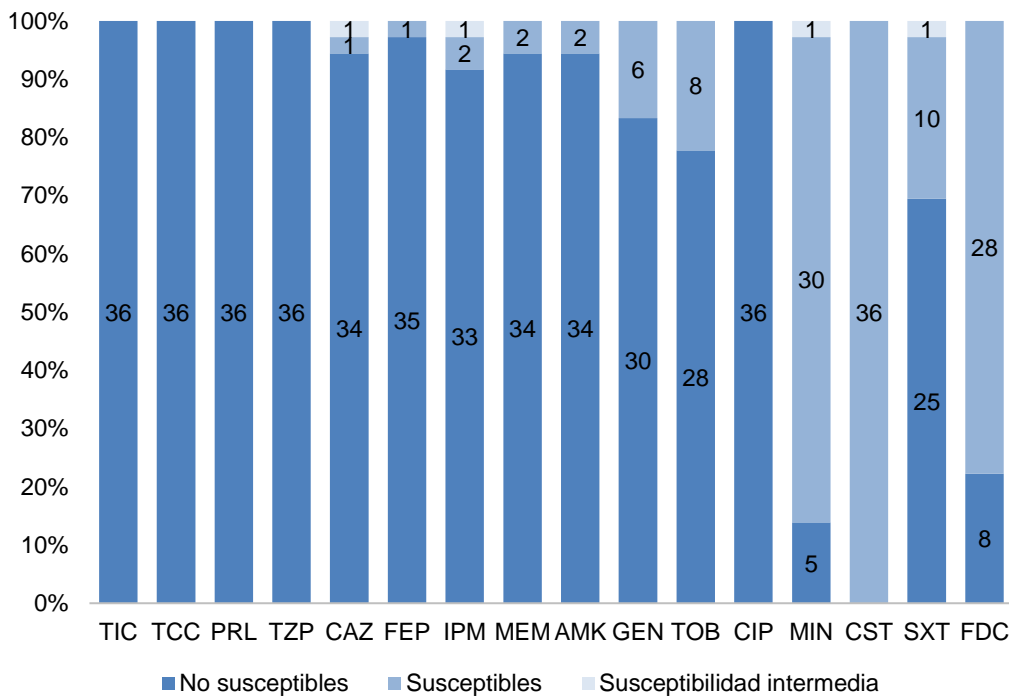


Figura 12. Resultados de resistencia a antibióticos* de los aislamientos de *A. baumannii* estudiados. El número de aislamientos dentro de cada categoría está representado dentro de las barras. *Ticarcilina (TIC), ticarcilina/ácido clavulánico (TCC), piperacilina (PRL), piperacilina/tazobactam (TZP), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP), imipenem (IPM), meropenem (MEM), amikacina (AMK), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), ciprofloxacino (CIP), minociclina (MIN), colistina (CST), trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) y cefiderocol (FDC).

RESULTADOS

Tabla 12. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los aislamientos *A. baumannii* estudiados. Los valores de resistencia están representados en negrita.

Aislamiento	CMI (mg/L)															
	TIC	TCC	PRL	TZP	CAZ	FEP	IPM	ME	AMK	GEN	TOB	CIP	MIN	CST	SXT	FDC
Ale1	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	4	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale2	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	>128	128	≥ 16	≥ 16	≥ 64	8	4	≥ 4	≥ 16	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale3	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	4	≥ 16	≥ 16	≥ 4	2	≤ 0.5	160	≤ 2
Ale4	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	8	≥ 16	4	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale7	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	2	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale8	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	1	4	128	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale9	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	4	≤ 0.5	≥ 320	> 2
Ale10	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	2	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale11	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	4	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale12	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	1	2	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale13	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	4	≤ 0.5	160	> 2
Ale14	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	4	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale15	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	4	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	160	≤ 2
Ale16	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	>128	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 4	2	≤ 0.5	≥ 320	> 2
Ale17	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	2	≤ 0.5	≥ 320	> 2
Ale18	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	>128	≥ 64	≥ 16	≥ 16	128	≤ 1	4	≥ 4	≤ 1	1	≥ 320	≤ 2
Ale19	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	128	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale20	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	8	≤ 0.5	160	> 2

Tabla 12. Continuación.

Aislamiento	CMI (mg/L)														FDC	
	TIC	TCC	PRL	TZP	CAZ	FEP	IPM	MEM	AMK	GEN	TOB	CIP	MIN	CST		SXT
Ale21	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	4	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	160	≤ 2
Ale22	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	0,125	0,125	≥ 16	≥ 16	≥ 64	8	2	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale23	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	16	32	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	160	≤ 2
Ale24	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	>128	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	4	≥ 4	≥ 16	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale25	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	>128	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≤ 1	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	> 2
Ale26	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale27	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	>128	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	8	≥ 4	≥ 16	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale28	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale29	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	2	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale30	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	4	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale31	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	1	≥ 320	≤ 2
Ale32	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	8	≥ 16	≥ 4	2	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale33	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	4	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale34	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	4	≥ 4	2	≤ 0.5	≥ 320	≤ 2
Ale35	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	≥ 320	> 2
Ale36	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale37	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≤ 0.5	≤ 20	≤ 2
Ale38	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 64	>128	≥ 16	≥ 16	>128	≥ 16	≥ 16	≥ 4	≤ 1	≤ 0.5	80	> 2

4. Tipado molecular

Los aislamientos se agruparon en seis clones internacionales, dentro de los cuales se pudieron diferenciar nueve *sequence types* del esquema Pasteur y siete del esquema Oxford. Para ilustrar las relaciones clonales de los aislamientos se generó un árbol de expansión mínima o *minimum spanning tree* basado en el cgMLST que se muestra en la Figura 13.

El clon mayoritario en el grupo de aislamientos fue el IC2 (47,2%), dentro del cual encontramos los linajes ST2 (n=6), ST570 (n=7) y ST600 (n=4). No se asignó ningún ST a estos aislamientos por el esquema Oxford debido a la duplicación del gen *gdhB*.

El segundo clon mayoritario fue el clon IC5 (27,78%), al cual pertenece el ST158 del esquema Pasteur. Además, según el esquema Oxford, y debido a la aparición de dos alelos diferentes por duplicación del gen *gdhB*, solo se pudieron asignar cuatro aislamientos al ST499 (Ale23, Ale26, Ale28, Ale36),

Dentro del clon IC4, nos encontramos con tres aislamientos que pertenecían al ST15 del esquema Pasteur. Posteriormente, según el esquema Oxford, estos aislamientos se subdividieron en dos linajes, el ST236 (Ale15, Ale21) y el ST104 (Ale22). Tres aislamientos fueron asignados al clon IC9, al cual pertenecen los ST85/ST1580 (Pasteur/Oxford).

Un único aislamiento fue asignado al clon IC7, del cual son parte los ST113 y ST2246 según el esquema Pasteur y Oxford, respectivamente. Y otro al clon IC8 y a los ST613/1158 (Pasteur/Oxford).

Por último, el aislamiento Ale30 fue considerado aislamiento sin relación clonal aparente o *singleton* ya que no pudo relacionarse con ninguno de los clones internacionales, y fue asignado al ST164 por el esquema Pasteur y al ST1418 por el esquema Oxford.

Posteriormente, por secuenciación masiva se comprobó que los aislamientos contenían las variantes del gen de carbapenemasa *bla*_{OXA-51} características de cada clon: *bla*_{OXA-66} (IC2), *bla*_{OXA-51} (IC4), *bla*_{OXA-65} (IC5), *bla*_{OXA-64} (IC7), *bla*_{OXA-68} (IC8), *bla*_{OXA-94} (IC9).

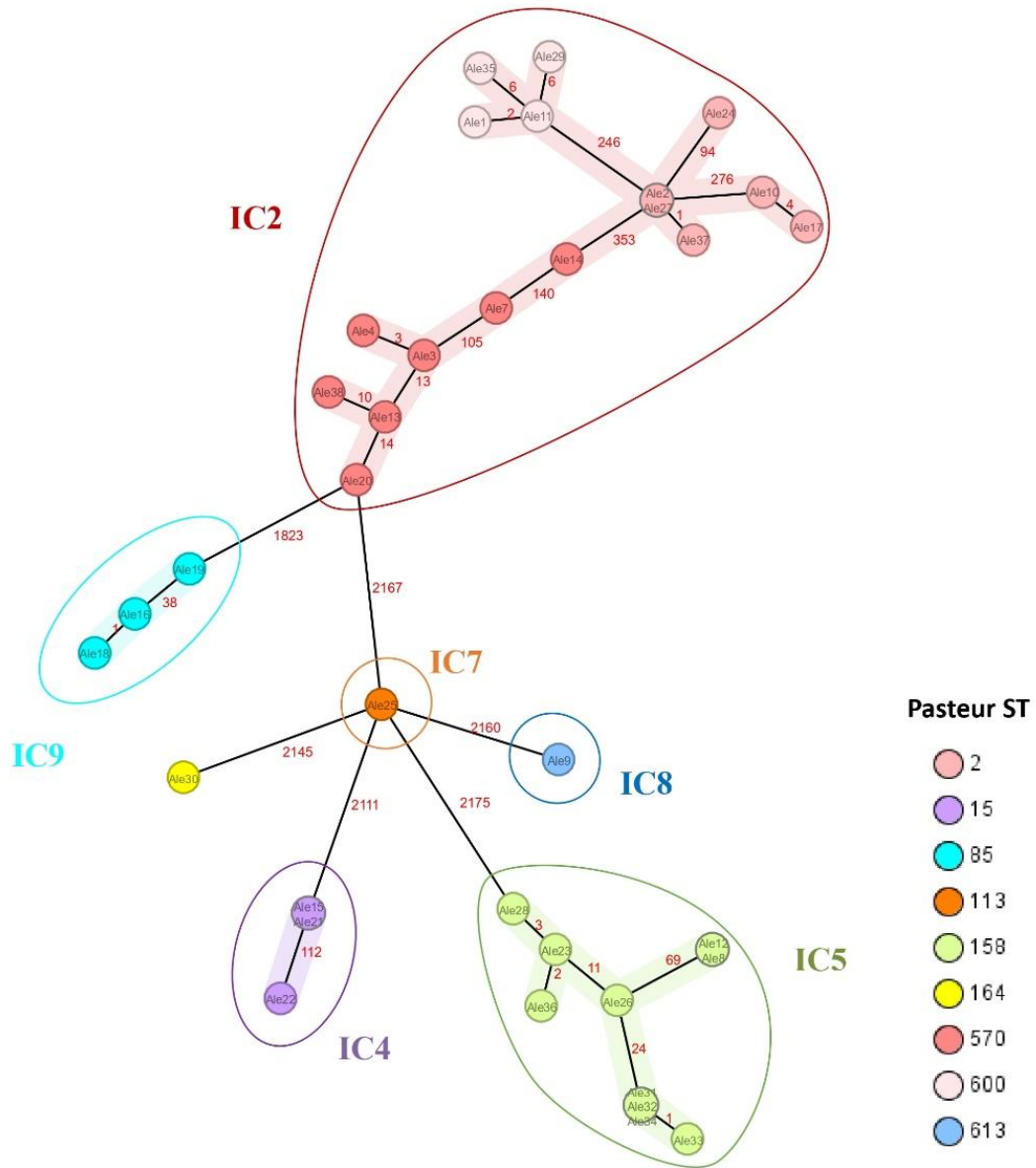


Figura 13. Árbol de expansión mínima de los 36 aislamientos de *A. baumannii* basado en 2390 alelos (genoma central) generado con Ridom SeqSphere+. Los nombres de los aislamientos están representados en el interior de los nodos. Los aislamientos están coloreados según el ST al que fueron asignados y agrupados en los clones internacionales (IC) a los que pertenecen.

5. Análisis del viruloma

El análisis del viruloma por secuenciación masiva del genoma de los clones identificados, reveló una gran variedad de genes implicados en la virulencia de los aislamientos (Tablas 13-19). Entre ellos, genes que codifican proteínas implicadas en la adherencia, formación de *biofilm* y evasión del sistema inmune (*Acinetobacter Trimeric Autotransporter*, pili tipo IV, *biofilm-controlling response regulator*, bomba de eflujo AdeFGH, proteínas responsables de *quorum sensing*, pili Csu, *biofilm associated protein*, *outer membrane protein*, poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina, proteínas de la cápsula, lipopolisacárido, *penicillin-binding protein G*); sistemas de secreción de proteínas tipo II y VI, exotoxinas (fosfolipasas C y D), exoenzimas (*Coagulation targeting metallo-endopeptidase*) y sistemas de captación de hierro (acinetobactinas).

Sin embargo, no todos los genes implicados en los procesos descritos estaban presentes en todos los aislamientos. El gen *cpaA*, que codifica para la *coagulation targeting metallo-endopeptidase* estaba presente en los clones IC8 e IC9. El gen *ata*, responsable del *Acinetobacter trimeric autotransporter* se identificó en los clones IC2, IC4, IC5 y el *singleton*. Los genes *abaR* y *abal* de *quorum sensing* se encontraron en todos los clones menos en el IC5. Por último, se encontraron diferentes genes implicados en la formación de la cápsula. Los aislamientos de los clones IC2, IC7 e IC9 compartían los mismos genes responsables de la cápsula, entre los que se incluía el gen *ptk*, encontrado en todos los aislamientos.

Tabla 13. Viruloma de los aislamientos *A. baumannii* pertenecientes al clon IC2.

	<i>Acinetobacter Trimeric Autotransporter</i>	<i>ata</i>
	Pili tipo IV	<i>pilB, pilC, gspO/pilD, pilF, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, fimT, fimV, tsap</i>
	Biofilm Controlling Response Regulator	<i>bfmR, bfmS</i>
	Bomba de eflujo AdeFGH	<i>adeF, adeG, adeH</i>
	Quorum sensing	<i>abaR</i>
	Pili Csu	<i>csuA, csuA/B, csuC, csuD, csuE</i>
Adherencia, formación de biofilm y modulación del sistema inmune	Biofilm Associated Protein	<i>bap</i>
	Outer Membrane Protein	<i>ompA</i>
	Poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina	<i>pgaA, pgaB, pgaC, pgaD</i>
	Cápsula	<i>tviB, galE, galU, pgi, ptk</i>
	Lipopolisacárido	<i>lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, lpsB</i>
	Penicillin-Binding Protein G	<i>pbpG</i>
Sistemas de secreción	Sistema de secreción tipo II	<i>gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspK, gspL, gspN</i>
	Sistema de secreción tipo VI	<i>tssA, tssB, tssC, tssF, tssG, clpV/tssH, vgrG/tssI, tssK, tssL, tssM, tagX</i>
Exotoxinas	Fosfolipasas C y D	<i>plc1, plc2, plcD</i>
Exoenzimas	Coagulation targeting metallo-endopeptidase	-
Captación de hierro	Acinetobactinas	<i>barA, barB, bauA, basA, basB, basC, basD, basE, basG, basJ, entE</i>

Tabla 14. Viruloma de los aislamientos *A. baumannii* pertenecientes al clon IC4.

	<i>Acinetobacter Trimeric Autoexporter</i>	<i>ata</i>
	Pili tipo IV	<i>pilA, pilB, pilC, gspO/pilD, pilF, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY 1, fimT, fimU, fimV, isaP</i>
	Biofilm Controlling Response Regulator	<i>bfmR, bfmS</i>
	Bomba de eflujo AdeFGH	<i>adeF, adeG, adeH</i>
	Quorum sensing	<i>abaR, abal</i>
	Pili Csu	<i>csuA, csuB, csuA/B, csuC, csuD, csuE</i>
Adherencia, formación de <i>biofilm</i> y modulación del sistema inmune	Biofilm Associated Protein	<i>bap</i>
	Outer Membrane Protein	<i>ompA</i>
	Poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina	<i>pgaA, pgaB, pgaC, pgaD</i>
	Cápsula	<i>tviB, galE, galU, pseB, pseC, pseG, pgi, ptk</i>
	Lipopolisacárido	<i>lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, lpsB</i>
	Penicillin-Binding Protein G	<i>pbpG</i>
Sistemas de secreción	Sistema de secreción tipo II	<i>gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspM, gspN</i>
	Sistema de secreción tipo VI	<i>tssA, tssC, tssF, tssG, clpV/tssH, vgrG/tssI, tssK, tssL, tssM, tagX</i>
Exotoxinas	Fosfolipasas C y D	<i>plc1, plc2, plcD</i>
Exoenzimas	Coagulation targeting metallo-endopeptidase	-
Captación de hierro	Acinetobactinas	<i>barA, barB, bauA, bauB, basA, basB, basC, basD, basE, basG, basJ, entE</i>

Tabla 15. Viruloma de los aislamientos *A. baumannii* pertenecientes al clon IC5.

	<i>Acinetobacter Trimeric Autotransporter</i>	<i>ata</i>
	Pili tipo IV	<i>pilB, pilC, gspO/pilD, pilF, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, fimT, fimV, tsap</i>
	Biofilm Controlling Response Regulator	<i>bfmR, bfmS</i>
	Bomba de eflujo AdeFGH	<i>adeF, adeG, adeH</i>
	Quorum sensing	-
Adherencia, formación de biofilm y modulación del sistema inmune	Pili Csu	<i>csuA/B, csuB, csuC, csuD, csuE</i>
	Biofilm Associated Protein	<i>bap</i>
	Outer Membrane Protein	<i>ompA</i>
	Poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina	<i>pgaA, pgaB, pgaC, pgaD</i>
	Cápsula	<i>tviB, pseC, pseG, pgi, ptk</i>
	Lipopolisacárido	<i>lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpsB</i>
	Penicillin-Binding Protein G	<i>pbpG</i>
	Sistema de secreción tipo II	<i>gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspK, gspL, gspN</i>
	Sistema de secreción tipo VI	<i>tssA, tssC, tssF, tssG, clp V/tssH, vgrG/tssI, tssK, tssL, tssM, tagX</i>
	Fosfolipasas C y D	<i>plc1, plc2, plcD</i>
Exotoxinas	Coagulation targeting metallo-endopeptidase	-
	Acinetobactinas	<i>barA, barB, basA, basB, basC, basD, basG, basJ, entE</i>

Tabla 16. Viruloma del aislamiento *A. baumannii* perteneciente al clon IC7.

	<i>Acinetobacter Trimeric Autoporter</i>	-
	Pili tipo IV	<i>pilB, pilC, gspO/pilD, pilF, pilG, pilH, pill, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, fimT, fimU, fimV, tsaP</i>
	Biofilm Controlling Response Regulator	<i>bfmR, bfmS</i>
	Bomba de eflujo AdeFGH	<i>adeF, adeG, adeH</i>
	Quorum sensing	<i>abaR, abal</i>
	Pili Csu	<i>csuA, csuB, csuA/B, csuC, csuD, csuE</i>
	Biofilm Associated Protein	<i>bap</i>
	Outer Membrane Protein	<i>ompA</i>
	Poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina	<i>pgaA, pgaB, pgaC, pgaD</i>
	Cápsula	<i>tviB, galE, galU, pgi, ptk</i>
	Lipopolisacárido	<i>lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, lpsB</i>
	Penicillin-Binding Protein G	<i>pbpG</i>
	Sistema de secreción tipo II	<i>gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspN, aspM</i>
	Sistema de secreción tipo VI	<i>tssA, tssB, tssC, hcp/tssD, tssE, tssF, tssG, clpV/tssH, vgrG/tssI, tssK, tssL, tssM, taqX, tse2</i>
	Fosfolipasas C y D	<i>plc1, plc2, plcD</i>
	Coagulation targeting metallo-endopeptidase	-
	Acinetobactinas	<i>barA, barB, bauA, bauB, basA, basB, basC, basD, basG, basJ, entE</i>
Adherencia, formación de biofilm y modulación del sistema inmune		
Sistemas de secreción		
Exotoxinas		
Exoenzimas		
Captación de hierro		

Tabla 17. Viruloma del aislamiento *A. baumannii* perteneciente al clon IC8.

	<i>Acinetobacter Trimeric Autotransporter</i>	-
	Pili tipo IV	<i>pilB, pilC, gspO/pilD, pilF, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, fimT, fimU, fimV, tsap</i>
	<i>Biofilm Controlling Response Regulator</i>	<i>bfmR, bfmS</i>
	Bomba de eflujo AdeFGH	<i>adeF, adeG, adeH</i>
	<i>Quorum sensing</i>	<i>abaR, abal</i>
	Pili Csu	<i>csuC, csuD, csuE</i>
	<i>Biofilm Associated Protein</i>	<i>bap</i>
	<i>Outer Membrane Protein</i>	<i>ompA</i>
	Poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina	<i>pgaA, pgaB, pgaC, pgaD</i>
	Cápsula	<i>galE, galU, ptk</i>
	Lipopolisacárido	<i>lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, lpsB</i>
	<i>Penicillin-Binding Protein G</i>	<i>pbpG</i>
	Sistema de secreción tipo II	<i>gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspM, gspN</i>
	Sistema de secreción tipo VI	<i>tssB, tssC, hcp/tssD, tssE, tssF, tssG, vgrG/tssI, tssK, tssM, tagX</i>
	Fosfolipasas C y D	<i>plc1, plc2, plcD</i>
	<i>Coagulation targeting metallo- endopeptidase</i>	<i>cpaA</i>
	Acinetobactinas	<i>barA, barB, bauA, bauB, basA, basB, basC, basD, basG, basJ, entE</i>
Adherencia, formación de <i>biofilm</i> y modulación del sistema inmune		
Sistemas de secreción		
Exotoxinas		
Exoenzimas		
Captación de hierro		

Tabla 18. Viruloma de los aislamientos *A. baumannii* pertenecientes al clon IC9.

	<i>Acinetobacter Trimeric Autotransporter</i>	-
	Pili tipo IV	<i>pilB, pilC, gspO/pilD, pilF, pilG, pilH, pilI, pilJ, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, fimT, fimV, tsaP</i>
	<i>Biofilm Controlling Response Regulator</i>	<i>bfmR, bfmS</i>
	Bomba de eflujo AdeFGH	<i>adeF, adeG, adeH</i>
	<i>Quorum sensing</i>	<i>abaR, abal</i>
	Pili Csu	<i>csuD, csuE</i>
	<i>Biofilm Associated Protein</i>	<i>bap</i>
	<i>Outer Membrane Protein</i>	<i>ompA</i>
	Poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina	<i>pgaA, pgaB, pgaC</i>
	Cápsula	<i>tviB, galE, galU, pgi, ptk</i>
	Lipopolisacárido	<i>lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, lpsB</i>
	<i>Penicillin-Binding Protein G</i>	<i>pbpG</i>
	Sistema de secreción tipo II	<i>gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspK, gspL, gspN</i>
	Sistema de secreción tipo VI	<i>tssA, tssB, tssC, tssF, tssG, clpV/tssH, vgrG/tssI, tssK, tssL, tssM, tagX</i>
	Fosfolipasas C y D	<i>plc1, plc2, plcD</i>
	<i>Coagulation targeting metallo-endopeptidase</i>	<i>cpaA</i>
	Acinetobactinas	<i>barA, barB, bauA, bauB, basA, basB, basC, basD, basG, basJ, entE</i>
Adherencia, formación de biofilm y modulación del sistema inmune		
Sistemas de secreción		
Exotoxinas		
Exoenzimas		
Captación de hierro		

Tabla 19. Viruloma del aislamiento *A. baumannii* Ale30.

		<i>ata</i>
	<i>Acinetobacter Trimeric Autotransporter</i>	
	Pili tipo IV	<i>pilA, pilB, pilC, gsp0/pilD, pilE, pilF, pilG, pilH, pill, pilI, pilJ, pilK, pilL, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilR, pilS, pilT, pilU, pilV, pilW, pilX, pilY1, fimT, fimU, fimV, tsaP</i>
	<i>Biofilm Controlling Response Regulator</i>	<i>bfmR, bfmS</i>
	Bomba de eflujo AdeFGH	<i>adeF, adeG, adeH</i>
	<i>Quorum sensing</i>	<i>abaR, abal</i>
	Pili Csu	<i>csuA/B, csuB, csuC, csuD, csuE</i>
	<i>Biofilm Associated Protein</i>	<i>bap</i>
	<i>Outer Membrane Protein</i>	<i>ompA</i>
	Poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina	<i>pgaA, pgaB, pgaC, pgaD</i>
	Cápsula	<i>galE, pgi, ptk</i>
	Lipopolisacárido	<i>lpxA, lpxB, lpxC, lpxD, lpxL, lpxM, lpsB</i>
	<i>Penicillin-Binding Protein G</i>	<i>pbpG</i>
	Sistema de secreción tipo II	<i>gspC, gspD, gspE1, gspE2, gspF, gspG, gspH, gspI, gspJ, gspK, gspL, gspM, gspN</i>
	Sistema de secreción tipo VI	<i>vgrG/tssI</i>
	Fosfolipasas C y D	<i>plc1, plc2, plcD</i>
	<i>Coagulation targeting metallo- endopeptidase</i>	-
	Acinetobactinas	<i>barA, barB, bauA, bauB, basA, basB, basC, basD, basG, basJ, entE</i>
Adherencia, formación de <i>biofilm</i> y modulación del sistema inmune		
Sistemas de secreción		
Exotoxinas		
Exoenzimas		
Captación de hierro		

6. Análisis de la expresión fenotípica de algunas características de virulencia

6.1. Producción de *biofilm*

Se observaron diferentes grados de producción de *biofilm* entre los aislamientos (Figura 14). El aislamiento con mayor capacidad de producción, incluso por encima del control positivo, fue el aislamiento Ale30, aislado de lavado broncoalveolar. Los aislamientos que pertenecían a los clones IC2, IC4 e IC7 también mostraron una gran capacidad de producción de *biofilm*.

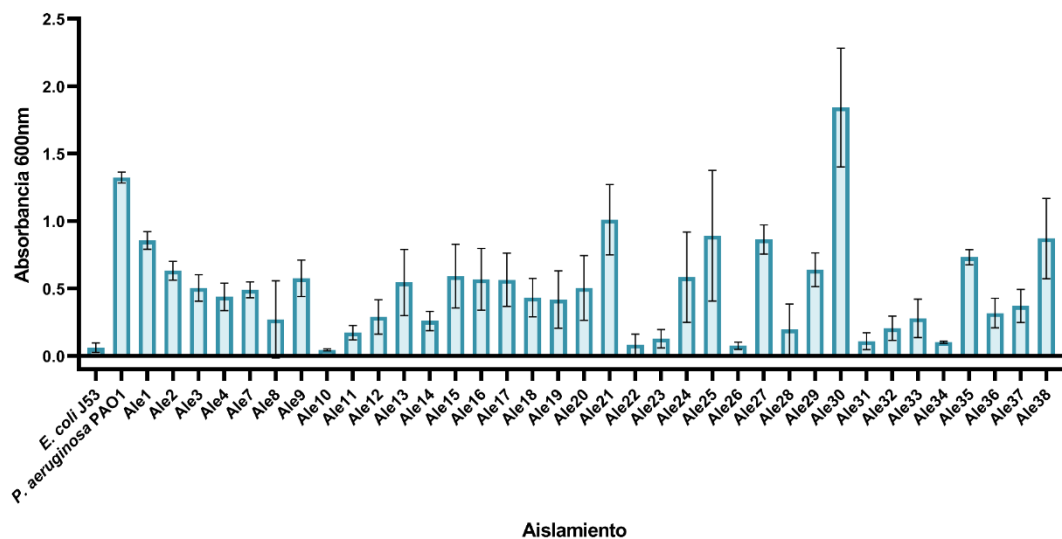


Figura 14. Datos de las medias \pm desviaciones estándar de la producción de *biofilm* de los aislamientos de *A. baumannii*. Las cepas *E. coli* J53 y *P. aeruginosa* PAO1 se emplearon como controles negativo y positivo, respectivamente.

6.2. Estudio de la motilidad

Se observaron diferentes fenotipos de motilidad en todos los aislamientos, a excepción de *A. baumannii* Ale37 y Ale1, en las que no se observó motilidad (Figura 15). La mayoría de aislamientos mostraban una morfología tipo nube con bordes bien definidos y/o ramificaciones (Ale2-12, Ale14-35), mientras que otros mostraron una morfología más similar a la del control positivo, en la que el aislamiento crece de forma radial desde el punto de inoculación (Ale13, Ale36, Ale38). Siguiendo la clasificación de morfotipos descrita por Cosgaya y colaboradores (125), los aislamientos Ale13, Ale36 y Ale38 mostraron una motilidad similar al morfotipo D, mientras que el resto de los aislamientos no encajaron dentro de ninguno de estos morfotipos.

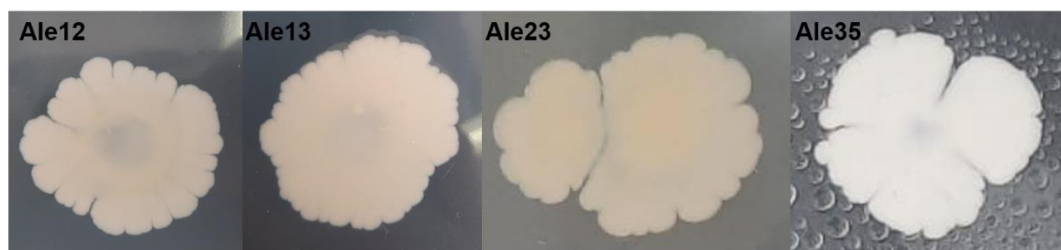


Figura 15. Fenotipos de motilidad observados en algunos aislamientos de *A. baumannii*. Como controles negativo y positivo se utilizaron las cepas *A. baumannii* ATCC19606 y ATCC17978, respectivamente.

7. Análisis del resistoma

Los experimentos de multiplex PCR fueron positivos para los genes *bla*_{OXA-51-like} (100%, n=36), *bla*_{OXA-23-like} (97,2%, n=35), *bla*_{NDM-like} (27,8%, n=10) y *bla*_{GES-like} (25%, n=9). En la Figura 16A se observan dos amplicones de 353 y 501 bp, correspondientes a los tamaños esperados para los genes *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23}, respectivamente. La Figura 16B, muestra un único amplicón de 517 bp, correspondiente al tamaño esperado para el gen *bla*_{NDM}.

Por último, en la Figura 16C se puede ver una banda de 416 bp, correspondiente al amplicón esperado del gen *bla*_{GES}.

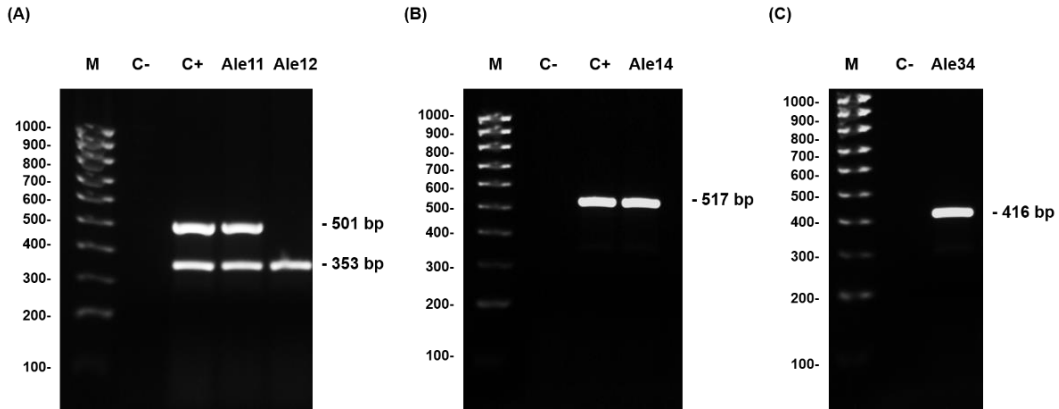


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de las técnicas multiplex PCR para los diferentes genes de carbapenemasas. (A) genes *bla*_{OXA}; (B) genes *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-48}; (C) genes *bla*_{IMI}, *bla*_{GES}, *bla*_{GIM}, *bla*_{IMP} e *ISAbA-1/bla*_{OXA-51-like}. M: marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V; C- y C+: control negativo y positivo, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante PCR se confirmaron mediante secuenciación masiva y se determinaron las variantes de las β-lactamasas (Tabla 20). Se identificaron ocho variantes del gen *bla*_{OXA-51}, entre las que se incluían: *bla*_{OXA-51} (n=3), *bla*_{OXA-64} (n=1), *bla*_{OXA-65} (n=10), *bla*_{OXA-66} (n=16), *bla*_{OXA-68} (n=1), *bla*_{OXA-91} (n=1), *bla*_{OXA-94} (n=3) y *bla*_{OXA-336} (n=1). El 94,4% de los aislamientos tenían el gen *bla*_{OXA-23} (n=34) y los aislamientos Ale10 y Ale25, además, tenían una segunda copia del gen *bla*_{OXA-23}. En el aislamiento Ale21, además del gen *bla*_{OXA-23} se encontró una copia de una variante de este mismo gen, denominada *bla*_{OXA-166}. Cabe destacar que en el aislamiento Ale28 se observó una deleción de cuatro pares de bases en la posición 203 del gen, que codifica para un codón de parada prematuro produciendo una proteína defectuosa. En un total de diez aislamientos (27,78%) se detectó el gen de carbapenemasa *bla*_{NDM-1}.

Se identificaron otros genes de betalactamasas como *bla*_{GES-35} y *bla*_{GES-11} en seis y tres aislamientos, respectivamente. Cuatro aislamientos tenían el gen *bla*_{PER-7}. También se encontraron múltiples variantes del gen de

RESULTADOS

cefalosporinasa cromosómico *bla*_{ADC}: *bla*_{ADC-73} (15), *bla*_{ADC-117} (9), *bla*_{ADC-211} (1), *bla*_{ADC-143} (2), *bla*_{ADC-263} (2), *bla*_{ADC-80} (3), *bla*_{ADC-25} (1), *bla*_{ADC-259} (1), *bla*_{ADC-57} (1), *bla*_{ADC-52} (1), *bla*_{ADC-199} (1). Y finalmente, el gen *bla*_{TEM-1} fue identificado en quince aislamientos.

Además de los genes de β -lactamasas, se identificaron genes de resistencia a otras clases de antibióticos como: aminoglicósidos *armA* (n=26), *strA* (n=11), *strB* (n=11), *aph(3')-Ia* (n=21), *aph(3')-VI* (n=30), *aph(3')-VIa* (n=3), *aac(6')-Ib* (n=15), *ant(3'')-II* (n=30), *ant(3'')-IIa* (n=6), *aadA1-pm* (n=13); tetraciclinas *tet(B)* (n=6), *tet(39)* (n=2); sulfonamidas *sul1* (n=24), *sul2* (n=6); trimetoprima *dfrA7* (n=12); macrólidos *mph(E)* (n=29), *msr(E)* (n=29); rifampicina *arr-2* (n=5) y cloranfenicol *cmIA5* (n=5), *catB8* (n=13), *catA1* (n=1) (Tabla 21).

La secuenciación reveló genes de otros mecanismos de resistencia a antibióticos como las bombas de eflujo. Se identificaron genes que codifican para cuatro familias de bombas de eflujo y sus reguladores: superfamilia MATE (*abeM*); superfamilia SMR (*abeS*); superfamilia MFS (*amvA*, *abaF* y *abaQ*); superfamilia RND (*adeA*, *adeB*, *adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adel*, *adeJ*, *adeK*, *adeL*, *adeN*, *adeR* y *adeS*) (Tabla 22).

Tabla 20. Genes de β-lactamasas encontrados por secuenciación masiva del genoma en los aislamientos estudiados. * Dos copias del mismo gen.

Aislamiento	<i>bla</i> _{OXA-51} -like	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{NDM} -like	<i>bla</i> _{GES} -like	<i>bla</i> _{PER} -like	<i>bla</i> _{ADC} -like	<i>bla</i> _{TEM} -like
Ale1	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale2	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale3	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale4	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale7	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale8	<i>bla</i> _{OXA-65}	-	-	<i>bla</i> _{GES-35}	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale9	<i>bla</i> _{OXA-68}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	<i>bla</i> _{PER-7}	<i>bla</i> _{ADC-211}	-
Ale10	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23} *	-	-	<i>bla</i> _{PER-7}	<i>bla</i> _{ADC-143}	-
Ale11	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale12	<i>bla</i> _{OXA-65}	-	-	<i>bla</i> _{GES-35}	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	-
Ale13	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale14	<i>bla</i> _{OXA-336}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale15	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-263}	-
Ale16	<i>bla</i> _{OXA-94}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	<i>bla</i> _{GES-11}	-	<i>bla</i> _{ADC-80}	-
Ale17	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	<i>bla</i> _{PER-7}	<i>bla</i> _{ADC-143}	-
Ale18	<i>bla</i> _{OXA-94}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	<i>bla</i> _{GES-11}	-	<i>bla</i> _{ADC-80}	-
Ale19	<i>bla</i> _{OXA-94}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	<i>bla</i> _{GES-11}	-	<i>bla</i> _{ADC-80}	-
Ale20	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-25}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale21	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23} /	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-263}	-

Tabla 20. Continuación.

Aislamiento	<i>bla</i> _{OXA-51} -like	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{NDM} -like	<i>bla</i> _{GES} -like	<i>bla</i> _{PER} -like	<i>bla</i> _{ADC} -like	<i>bla</i> _{TEM} -like
Ale22	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-259}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale23	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale24	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	-
Ale25	<i>bla</i> _{OXA-64}	<i>bla</i> _{OXA-23} *	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	<i>bla</i> _{PER-7}	<i>bla</i> _{ADC-57}	-
Ale26	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	<i>bla</i> _{GES-35}	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale27	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale28	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23} *	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale29	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale30	<i>bla</i> _{OXA-91}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-52} / <i>bla</i> _{ADC-199}	-
Ale31	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale32	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale33	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	<i>bla</i> _{GES-35}	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale34	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	<i>bla</i> _{GES-35}	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale35	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale36	<i>bla</i> _{OXA-65}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	<i>bla</i> _{GES-35}	-	<i>bla</i> _{ADC-117}	-
Ale37	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	-	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}
Ale38	<i>bla</i> _{OXA-66}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	<i>bla</i> _{ADC-73}	<i>bla</i> _{TEM-1}

Tabla 21. Genes de resistencia adicionales identificados por secuenciación masiva del genoma en los aislamientos estudiados.

Aislamientos	Trimetoprima	Tetraciclinas	Sulfonamidas	Aminoglicósidos	Macrólidos	Rifampicina	Cloranfenicol
Ale1	-	-	-	<i>armA</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>ant(3'')-IIIa</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	-
Ale2	-	<i>tet(B)</i>	-	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>ant(3'')-II</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	-
Ale3	-	-	-	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>ant(3'')-II</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	-
Ale4	-	-	-	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>ant(3'')-II</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	-
Ale7	-	-	<i>sul1</i>	<i>armA</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i> , <i>aadA1-pm</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	<i>catB8</i>
Ale8	<i>dfrA7</i>	-	<i>sul1</i>	<i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i>	-	-	-
Ale9	-	<i>tet(B)</i> , <i>tet(39)</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>ant(3'')-IIa</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	<i>arr-2</i>	<i>cmIA5</i>
Ale10	-	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i> , <i>aadA1-pm</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	<i>catB8</i>
Ale11	-	-	-	<i>armA</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>ant(3'')-IIa</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	-
Ale12	<i>dfrA7</i>	-	<i>sul1</i>	<i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i>	-	-	-
Ale13	-	-	<i>sul1</i>	<i>armA</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i> , <i>aadA1-pm</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	<i>catB8</i>
Ale14	-	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>armA</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i> , <i>aadA1-pm</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	<i>catB8</i>
Ale15	-	-	<i>sul1</i>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-VIa</i> , <i>ant(3'')-II</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	<i>arr-2</i>	<i>cmIA5</i>
Ale16	<i>dfrA7</i>	-	<i>sul1</i>	<i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i>	-	-	-
Ale17	-	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i> , <i>aadA1-nm</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	<i>catB8</i>
Ale18	<i>dfrA7</i>	-	<i>sul1</i>	<i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i>	-	-	-
Ale19	<i>dfrA7</i>	-	<i>sul1</i>	<i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i>	-	-	-
Ale20	-	-	<i>sul1</i>	<i>armA</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aph(3')-VIa</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ant(3'')-II</i> , <i>aadA1-pm</i>	<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i>	-	<i>catB8</i>

Tabla 21. Continuación.

Aislamientos	Trimetoprima	Tetraciclinas	Sulfonamidas	Aminoglicósidos	Macrólidos	Rifampicina	Cloranfenicol
Ale21	-	-	sul1	armA, strA, strB, aph(3')-VI, ant(3'')-II	mph(E), msr(E)	arr-2	cmIA5
Ale22	-	-	sul1, sul2	armA, strA, strB, aph(3')-VI, ant(3'')-II	mph(E), msr(E)	arr-2	cmIA5
Ale23	-	-	sul1	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, aac(6')-Ib, ant(3'')-II, aadA1-pm	mph(E), msr(E)	-	catB8
Ale24	-	tet(B)	-	armA, strA, strB, aph(3')-VI, ant(3'')-II	mph(E), msr(E)	-	catA1
Ale25	-	tet(B)	sul1, sul2	armA, strA, strB, aph(3')-VI, aph(3')-VIIa, ant(3'')-IIa	mph(E), msr(E)	arr-2	cmIA5
Ale26	dfrA7	-	sul1	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VIIa, aac(6')-Ib, ant(3'')-II, aadA1-pm	mph(E), msr(E)	-	catB8
Ale27	-	tet(B)	-	armA, strA, strB, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-II	mph(E), msr(E)	-	-
Ale28	dfrA7	-	sul1	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, aac(6')-Ib, ant(3'')-II, aadA1-pm	mph(E), msr(E)	-	catB8
Ale29	-	-	-	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-IIa	mph(E), msr(E)	-	-
Ale30	-	tet(39)	-	aph(3')-VI, ant(3'')-II	mph(E), msr(E)	-	-
Ale31	dfrA7	-	sul1	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-II, aadA1-pm	mph(E), msr(E)	-	catB8
Ale32	dfrA7	-	sul1	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-II, aadA1-pm	mph(E), msr(E)	-	catB8
Ale33	dfrA7	-	sul1	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-II, aadA1-pm	mph(E), msr(E)	-	catB8
Ale34	dfrA7	-	sul1	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-II, aadA1-pm	mph(E), msr(E)	-	catB8
Ale35	-	-	-	armA, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-IIa	mph(E), msr(E)	-	-
Ale36	dfrA7	-	sul1	aph(3')-VI, aac(6')-Ib, ant(3'')-II	-	-	-
Ale37	-	tet(B)	-	armA, strA, strB, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-II	mph(E), msr(E)	-	-
Ale38	-	-	-	aph(3')-Ia, aph(3')-VI, ant(3'')-II	-	-	-

Tabla 22. Genes de bombas de eflujo identificados en los aislamientos estudiados.

Aislamiento	<i>adeA</i>	<i>adeB</i>	<i>adeC</i>	<i>adeF</i>	<i>adeG</i>	<i>adeH</i>	<i>adel</i>	<i>adeJ</i>	<i>adeK</i>	<i>adeL</i>	<i>adeN</i>	<i>adeR</i>	<i>adeS</i>	<i>abeM</i>	<i>abeS</i>	<i>abaF</i>	<i>abaQ</i>	<i>amvA</i>
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 22. Continuación.

Aislamiento	adeA	adeB	adeC	adeF	adeG	adeH	adel	adeJ	adeK	adeL	adeN	adeR	adeS	abeM	abeS	abaF	abaQ	amvA
21	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
26	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
30	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
31	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
36	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

8. Estudio del contexto genético de los genes de β-lactamasas

El estudio de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva del genoma, permitió la identificación de elementos genéticos móviles cerca de los genes de β-lactamasas más importantes.

8.1. Contexto genético de los genes de carbapenemasas

Los genes *bla*_{OXA-23} se encontraron dentro de dos estructuras diferentes. En los aislamientos pertenecientes a los clones IC2, IC4 e IC7 y en el aislamiento Ale30, los genes *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-166} se encontraron dentro del transposón Tn2006, compuesto por una secuencia *ISAbal* upstream del gen *bla*_{OXA-23}, seguido del gen de ATPasa truncado, DEAD/DEAH box, metilasa de ADN y una secuencia *ISAbal* en dirección opuesta a la primera (Figura 17A). Mientras que en los aislamientos pertenecientes a los clones IC5, IC8 e IC9 el gen se localizó dentro del transposón Tn2008, cuya estructura incluye una *ISAbal* upstream del gen *bla*_{OXA-23}, seguido del gen de ATPasa truncado (Figura 17B).

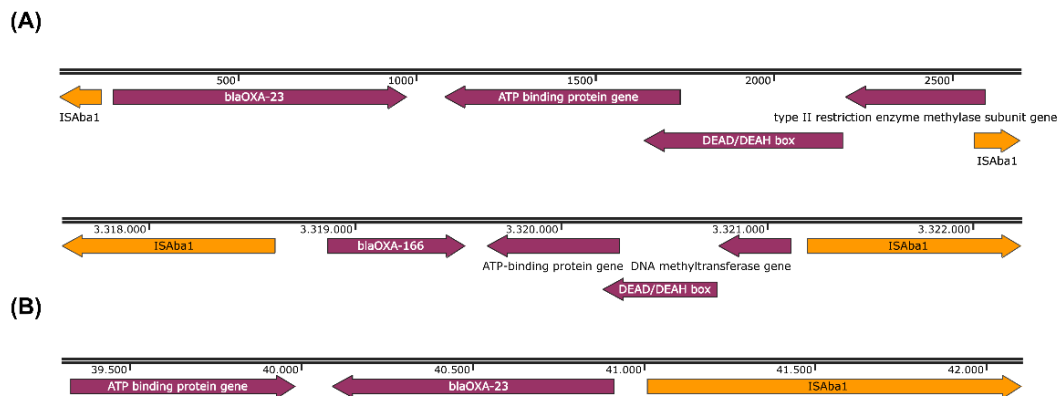


Figura 17. Diferentes contextos genéticos de las variantes del gen *bla*_{OXA-23} encontradas en los aislamientos de Alejandría. (A) Transposón Tn2006; (B) Transposón Tn2008. Las flechas indican el sentido del gen.

No se hallaron secuencias de inserción en el entorno de las variantes del gen *bla*_{OXA-51} (Figura 18).

RESULTADOS

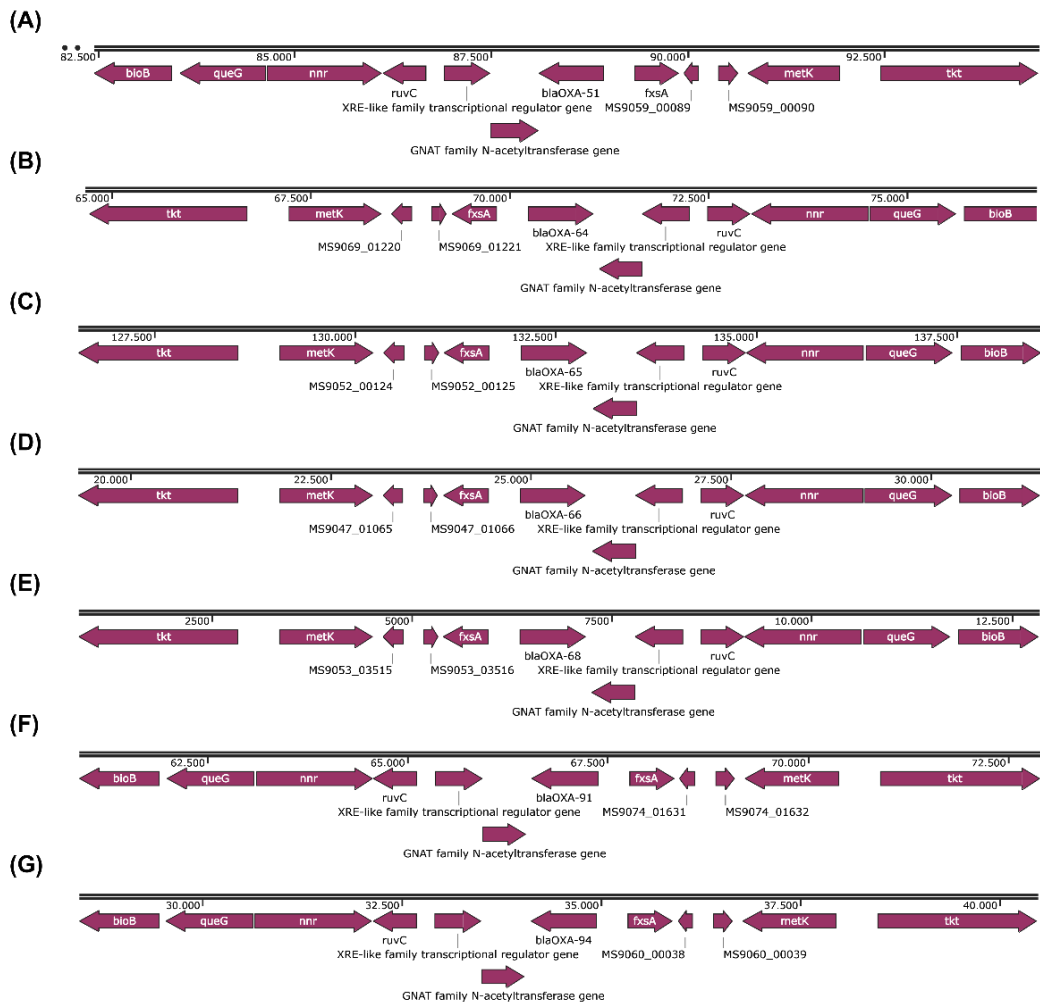


Figura 18. Contexto genético de las variantes del gen *bla*_{OXA-51} de los aislamientos estudiados. (A) *bla*_{OXA-51}; (B) *bla*_{OXA-64}; (C) *bla*_{OXA-65}; (D) *bla*_{OXA-66}; (E) *bla*_{OXA-68}; (F) *bla*_{OXA-91}; y (G) *bla*_{OXA-94}. Las flechas indican el sentido del gen.

En cuanto a los genes *bla*_{NDM-1}, en todos los aislamientos se localizaron dentro del transposón truncado Δ Tn125, el cual es una isoforma del transposón Tn125 que ha sido truncado por una secuencia de inserción IS*Aba14* en el extremo 3' (Figura 19).

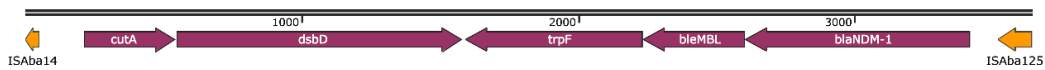


Figura 19. Contexto genético del gen *bla*_{NDM-1} en los aislamientos estudiados. Las flechas indican el sentido del gen.

8.2. Contexto genético de otros genes de β-lactamasas

El gen *bla*_{PER-7} se localizó dentro de una estructura compleja que conecta un integrón de clase 1 con un elemento *ISCR1*. Además, en esta estructura, el gen de β-lactamasa iba acompañado de otros genes de resistencia a antibióticos como *sul1*, *cmIA5* y *arr-2* (Figura 20).

En cuanto a los genes *bla*_{GES-11} y *bla*_{GES-35}, estos se localizaron dentro de un integrón de clase 1, acompañado de otros genes de resistencia a aminoglicósidos (*aac(6')-Ib*), trimetoprima (*dfrA7*) y sulfonamidas (*sul1*) (Figura 21).

Los genes *bla*_{ADC-25}, *bla*_{ADC-73} (excepto en el aislamiento Ale12), *bla*_{ADC-143}, *bla*_{ADC-199}, *bla*_{ADC-259} y *bla*_{ADC-263} tenían una secuencia *ISAb1* *upstream* del gen (Figura 22).

Por último, el análisis del entorno genético del gen *bla*_{TEM-1}, localizó la secuencia de inserción *IS26* *upstream* del gen en cinco de los aislamientos (Ale7, Ale13, Ale14, Ale20 y Ale22) (Figura 23).

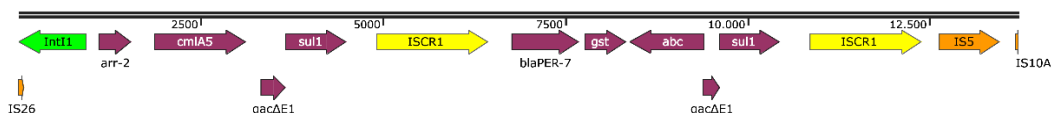


Figura 20. Contexto genético del gen *bla*_{PER-7} en los aislamientos estudiados. Las flechas indican el sentido del gen.

RESULTADOS

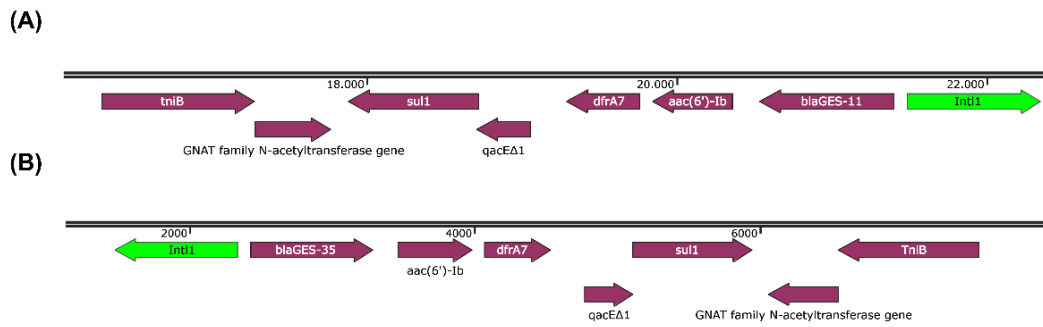


Figura 21. Contexto genético de las variantes del gen *bla_{GES}* en los aislamientos estudiados. (A) *bla_{GES-11}*; y (B) *bla_{GES-35}*. Las flechas indican el sentido del gen.



Figura 22. Contexto genético de las variantes del gen *bla_{ADC}* en los aislamientos estudiados. (A) *bla_{ADC-25}*; (B) *bla_{ADC-73}*; (C) *bla_{ADC-143}*; (D) *bla_{ADC-199}*; (E) *bla_{ADC-259}*; y (F) *bla_{ADC-263}*. Las flechas indican el sentido del gen.

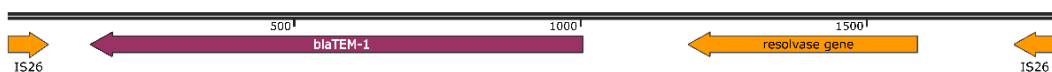


Figura 23. Contexto genético del gen *bla_{TEM-1}* en los aislamientos estudiados. Las flechas indican el sentido del gen.

9. Plásmidos y localización de los genes de resistencia a antibióticos

Las extracciones de plásmidos mediante lisis convencional mostraron en casi todos los aislamientos estudiados diferentes perfiles de plásmidos en un rango de 1,7 a 44 Kb (Figura 24). Mediante la técnica de S1-PFGE se identificaron plásmidos de gran tamaño de entre 194 y 237 Kb en los aislamientos Ale9, Ale12, Ale15, Ale21, Ale22 y Ale25 (Figura 25). El tamaño y número de plásmidos identificados mediante las dos técnicas están recogidos en la Tabla 23.

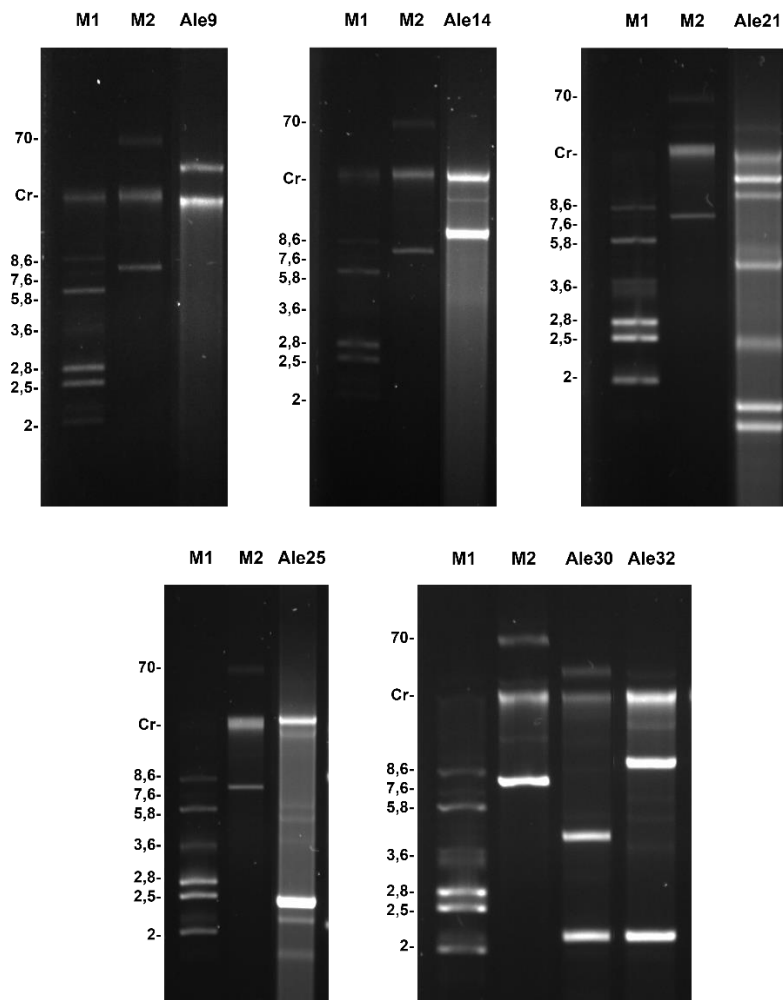


Figura 24. Ejemplos de los perfiles plasmídicos identificados en los aislamientos de *A. baumannii* mediante lisis convencional. Los pesos moleculares están indicados en Kb. Marcadores de pesos moleculares: M1 (*E. coli* CECT 678 (NCTC 50193)) y M2 (*E. coli* CECT 679 (NCTC 50192)). Cr: cromosoma.

RESULTADOS

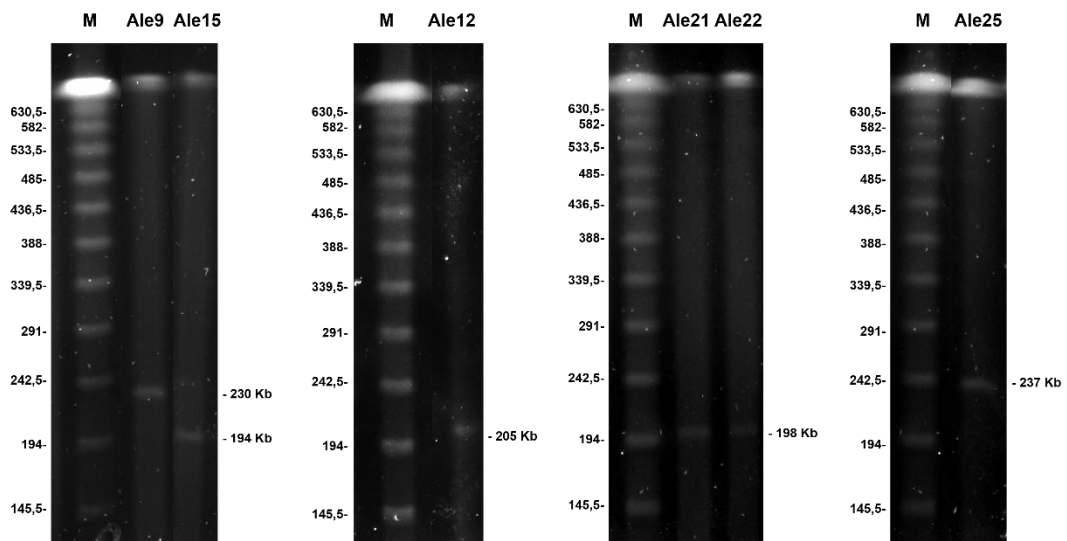


Figura 25. Plásmidos identificados por S1-PFGE. Los pesos moleculares están indicados en Kb. M: marcador de peso molecular CHEF *DNA Size Standard*, 48.5-1,000 kb, *Lambda Ladder*.

Tabla 23. Perfiles plasmídicos de los aislamientos estudiados obtenidos por lisis convencional y S1-PFGE.

Aislamiento	Plásmidos (Kb)									
Ale 1	4,6	7,6	0,7							
Ale2	3,3	9,5	0,7							
Ale3	8,1	2,2	8,1							
Ale4	36,6	22,5	19,4	9	7,2	2,1				
Ale7	30,4	18,6	10,3	7,5						
Ale8	27,4	16,3	9	6,8	4,9	3,4	2,1			
Ale9	230	44,1								
Ale10	14,3	6,4								
Ale11	25,9	15,8	9,1							
Ale12	205	12								
Ale13	17	9,8	6,9							
Ale14	18	9,8								
Ale15	194	19,9	13,1	9,8	4,1	2,8	2,4	1,7	1,5	
Ale16	14,7	6,1								
Ale17	14,3	6,1								
Ale18	-									
Ale19	-									
Ale20	36,6	15,9	10,7	7,2						
Ale21	197	39,9	14,8	10,9	5,1	4,6	2,4	1,7	1,5	

Tabla 23. Continuación.

Aislamiento	Plásmidos (Kb)								
Ale22	198	16,4	8,6	5,7	4,6	2,6	2,3		
Ale23	16,7	9,7	2,1						
Ale24	29,3	17	10,1	7,5	4,4				
Ale25	237	32,4	20	6	5,1	3,8	2,4	2,1	1,7
Ale26	16,1	9	4,7	3,8	3,4	2,1			
Ale27	38,6	17,9	10,4						
Ale28	17,1	9,6	5,8	4,9	3,7	2,1			
Ale29	38,1	20,2							
Ale30	43,1	21,1	15	9,5	5,3	4,4	3,1	2,1	
Ale31	41,9	19,4	10,6	6,4	5,2	4	2,1		
Ale32	40,7	19,1	10,3	6,4	5,2	4	2,1		
Ale33	-								
Ale34	39,5	18,5	10,3	6,3	5,2	4	2,1		
Ale35	39	20,2	11,4	4,1					
Ale36	29,1	16,2	8,9	4,8	3,4	2			
Ale37	32	17,3	10						
Ale38	27,4	16,2	9,5	3,8					

En cuanto a la clasificación de los plásmidos según el tipo de replicasa, los experimentos de tipado de replicones por PCR dieron positivo para los genes que codifican las replicasas previamente descritas Aci1/Aci2, Aci4, Aci6, Aci8/Aci9, p2S1 y pAB49, que pertenecen a los grupos de homología GR2, GR4, GR6, GR8, GR12 y GR16, respectivamente (Tabla 24). Veintiún aislamientos tenían una combinación de dos replicasas descritas: Aci1/Aci2 + Aci6 (n=6); Aci1/Aci2 + p2S1 (n=1); p2S1+Aci6 (n=10); Aci8/9 + Aci6 (n=1); Aci4+Aci8/Aci9 (n=3).

RESULTADOS

Tabla 24. Replicasas identificadas por PCR en los aislamientos de *A. baumannii* estudiados.

Aislamiento	Aci1/Aci2 (GR2)	Aci4 (GR4)	Aci6 (GR6)	Aci8/9 (GR8)	p2S1 (GR12)	pAB49 (GR16)
Ale1	+	-	-	-	-	-
Ale2	+	-	+	-	-	-
Ale3	+	-	-	-	-	-
Ale4	-	-	-	-	-	-
Ale7	+	-	-	-	-	-
Ale8	-	-	+	-	+	-
Ale9	+	-	-	-	+	-
Ale10	-	-	+	+	-	-
Ale11	+	-	-	-	-	-
Ale12	-	-	+	-	+	-
Ale13	+	-	+	-	-	-
Ale14	+	-	-	-	-	-
Ale15	-	+	-	+	-	-
Ale16	-	-	+	-	-	-
Ale17	-	-	-	+	-	-
Ale18	-	-	+	-	-	-
Ale19	-	-	+	-	-	-
Ale20	+	-	+	-	-	-
Ale21	-	+	-	+	-	-
Ale22	-	+	-	+	-	-
Ale23	-	-	+	-	+	-
Ale24	+	-	+	-	-	-
Ale25	-	-	+	-	-	-
Ale26	-	-	+	-	+	-
Ale27	+	-	+	-	-	-
Ale28	-	-	+	-	+	-
Ale29	+	-	+	-	-	-
Ale30	-	-	-	-	-	+
Ale31	-	-	+	-	+	-
Ale32	-	-	+	-	+	-
Ale33	-	-	+	-	+	-
Ale34	-	-	+	-	+	-
Ale35	+	-	-	-	-	-
Ale36	-	-	+	-	+	-
Ale37	-	-	+	-	-	-
Ale38	-	-	+	-	-	-

La localización de los genes de β -lactamasas mediante experimentos de hibridación con sondas de ADN localizó los genes en diferentes estructuras. En las hibridaciones con la sonda *bla*_{NDM} obtuvimos señal a la altura de 20 Kb en los filtros con ADN obtenido por lisis convencional de los aislamientos Ale1, Ale7, Ale11, Ale13, Ale29 y Ale38; y una señal de 1000 Kb en la hibridación del filtro de S1-PFGE del aislamiento Ale25 (Figura 26A). No se obtuvo ninguna señal de hibridación en los aislamientos Ale14, Ale20 y Ale35. Respecto a las hibridaciones con la sonda del gen *bla*_{PER} se obtuvo una señal de aproximadamente 21,2 Kb en los aislamientos Ale9 y Ale25 (Figura 26B), y ninguna señal en los aislamientos Ale10 y Ale17. Por último, las hibridaciones para detectar los genes *bla*_{GES} mostraron una señal de aproximadamente 21,2 Kb en todos los aislamientos, y una señal adicional de aproximadamente 70 Kb en los aislamientos Ale12, Ale18, Ale19, Ale33 y Ale34 (Figura 26C).

RESULTADOS

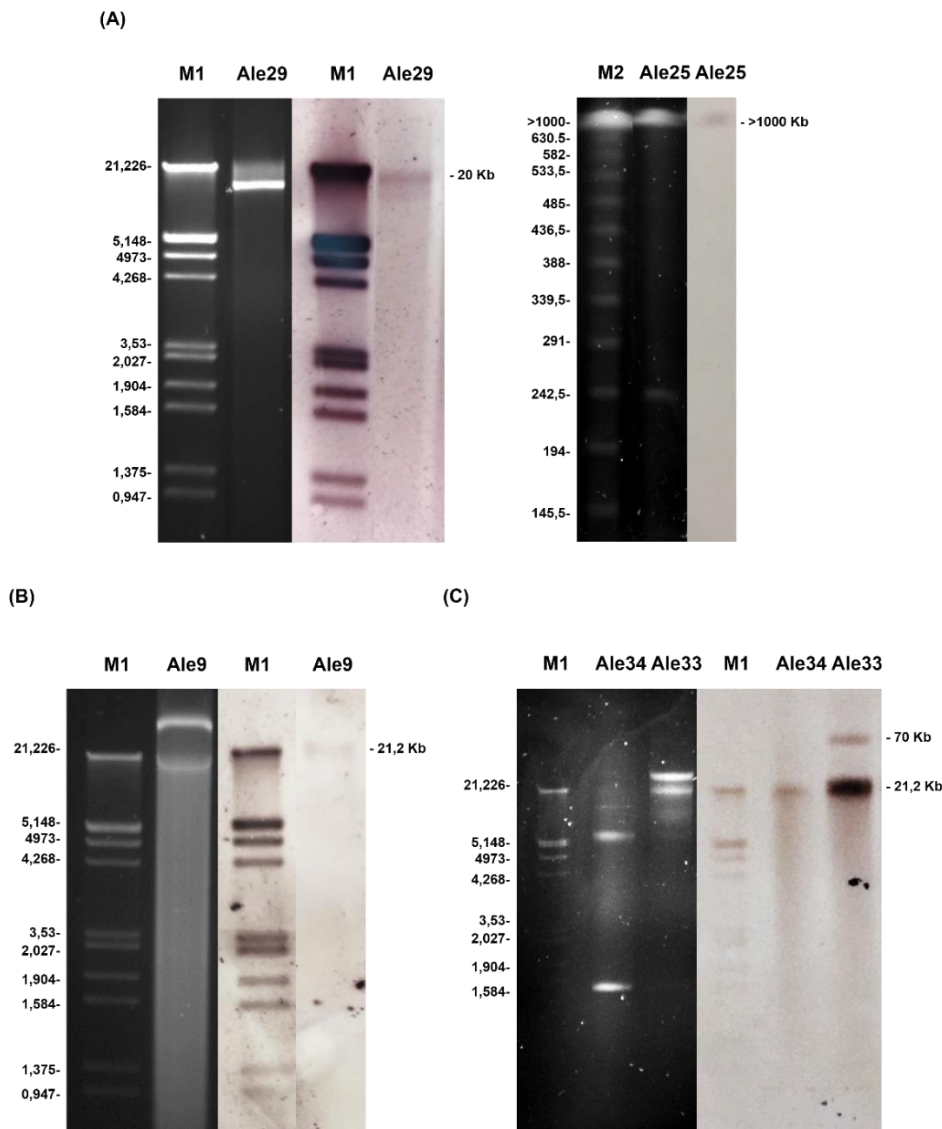


Figura 26. Ejemplos de hibridaciones con sondas de ADN de diferentes genes de β -lactamasas de los aislamientos estudiados. (A) *bla*_{NDM}; (B) *bla*_{PER}; y (C) *bla*_{GES}. M1 y M2: marcadores de peso molecular *DNA Molecular Weight Marker III DIG-labeled* y *CHEF DNA Size Standard*, 48.5-1,000 kb, *Lambda Ladder*, respectivamente. Los geles de electroforesis correspondientes se muestran al lado de cada filtro de hibridación.

En base a los resultados previos, se escogieron siete aislamientos representativos de cada clon internacional y diferentes combinaciones de replicasas para la secuenciación de plásmidos y el ensamblaje híbrido: Ale9 (IC8; GR2 + GR12), Ale10 (IC2; GR6 + GR8), Ale18 (IC9; GR6), Ale20 (IC2; GR2 + GR6), Ale21 (IC4; GR4 + GR8), Ale25 (IC7; GR6), Ale26 (IC5; GR6 + GR12).

La secuenciación de los aislamientos seleccionados nos permitió conocer al detalle la estructura de los plásmidos y su tamaño, clasificarlos y definir la localización de los genes de resistencia a antibióticos en los diferentes clones (Tabla 25).

Tabla 25. Plásmidos identificados por secuenciación y replicasas detectadas por comparación con la base de datos *Acinetobacter Plasmid Typing database* (<https://github.com/MehradHamidian/AcinetobacterPlasmidTyping>) con un 95% de identidad mínima.

Aislamiento	Clon Internacional	Plásmidos (Kb)	Replicasas <i>Acinetobacter</i> Plasmid Typing database	AB-PBRT (Bertini)
Ale9	IC8	205,657	Rep_3 family protein R3-T60	-
Ale10	IC2	70,016	RepPriCT_1 family protein RP-T1	RepAci6
		10,931	Rep_3 family protein R3 -T4	RepAci9
Ale18	IC9	80,303	RepPriCT_1 family protein RP-T1	RepAci6
Ale20	IC2	88,488	RepPriCT_1 family protein RP-T1 / Rep_3 family protein R3 -T1	RepAci6 / RepAci1
Ale21	IC4	199,267	Rep_3 family protein R3-T60 / Rep_3 family protein R3-T13	-
		14,246	-	-
		8,771	Rep_3 family protein R3-T14	-
		5,234	-	-
Ale25	IC7	240,879	Rep_3 family protein R3-T60	-
		70,4	RepPriCT_1 family protein RP-T1	RepAci6
		22,3	-	-
Ale26	IC5	2,740	-	-
		96,763	RepPriCT_1 family protein RP-T1	RepAci6
		4,955	Rep_3 family protein R3-T15	-

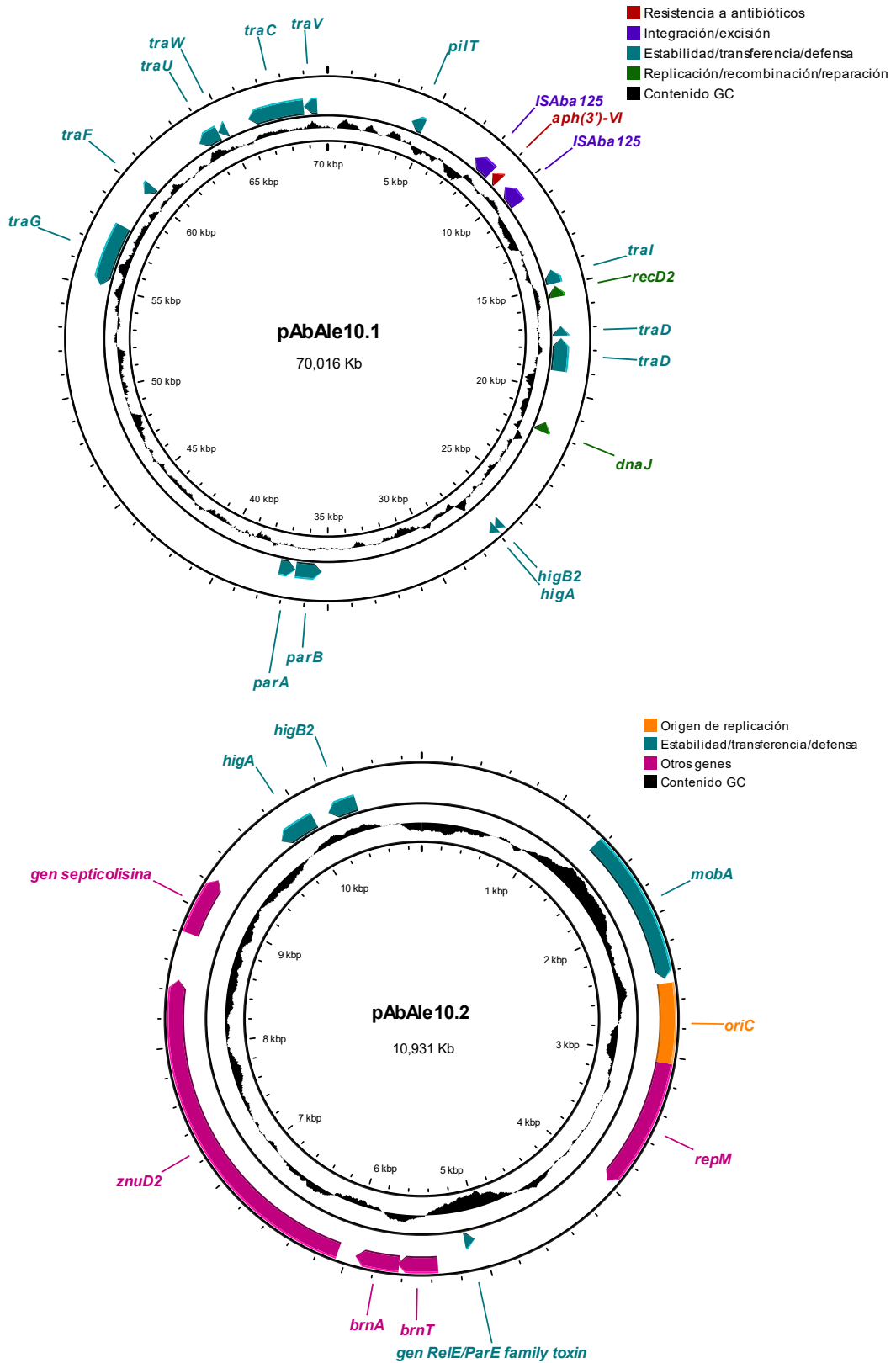


Figura 28. Plásmidos pAbAle10.1 y pAbAle10.2 identificados por secuenciación masiva en el aislamiento Ale10. Los genes están clasificados según su función en los diferentes colores indicados en la leyenda. Las flechas indican el sentido del gen.

RESULTADOS

En el aislamiento Ale18 se identificó un único plásmido conjugativo de 80,303 Kb, el cual contenía los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{GES-11}, *aph*(3')-VI, *aac*(6')-Ib, *sul1* y *dfrA7* (Figura 29). El resto de genes de resistencia a antibióticos estaban localizados en el cromosoma. Además de los genes de resistencia, este plásmido también contenía el gen de resistencia a antisépticos *qacEΔ1*.

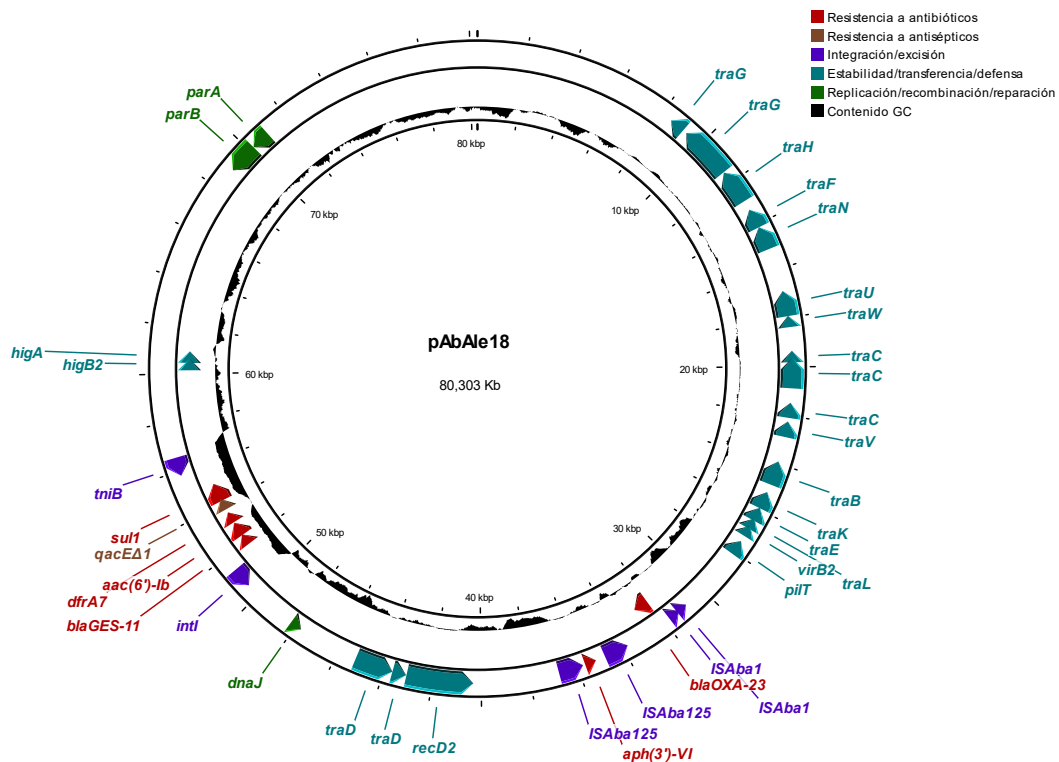


Figura 29. Plásmido pAbAle18 identificado por secuenciación masiva en el aislamiento Ale18. Los genes están clasificados según su función en los diferentes colores indicados en la leyenda. Las flechas indican el sentido del gen.

El aislamiento Ale20 tenía un único plásmido conjugativo de 88,488 Kb el cual codificaba el gen de resistencia a aminoglicósidos *aph*(3')-VIa (Figura 30). El resto de genes de resistencia se localizaron en el cromosoma.

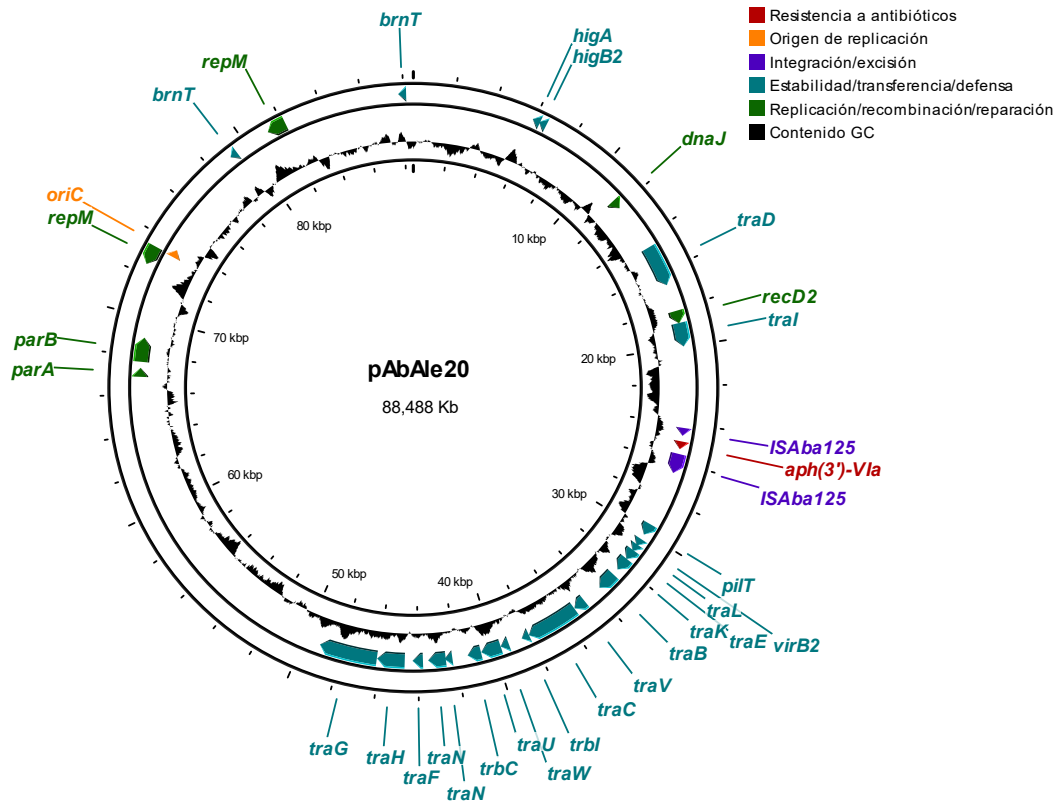


Figura 30. Plásmido pAbAle20 identificado por secuenciación masiva en el aislamiento Ale20. Los genes están clasificados según su función en los diferentes colores indicados en la leyenda. Las flechas indican el sentido del gen.

La secuenciación de plásmidos del aislamiento Ale21 reveló la presencia de un plásmido conjugativo de 199,267 Kb, dos plásmidos movilizables de 14,246 Kb y 8,771 Kb, y un plásmido no movilizable de 5,234 Kb (Figura 31). Los genes *armA*, *strA*, *strB*, *sul1*, *mph(E)*, *msr(E)*, *arr-2* y *cmIA5* se localizaron en el plásmido de 199,267 Kb, mientras que el resto de genes de resistencia a antibióticos estaban codificados en el cromosoma. Cabe resaltar la presencia de genes implicados en la movilización como *mobA*, *mobC* y *mobS* en los plásmidos pAbAle21.2 y pAbAle21.3.

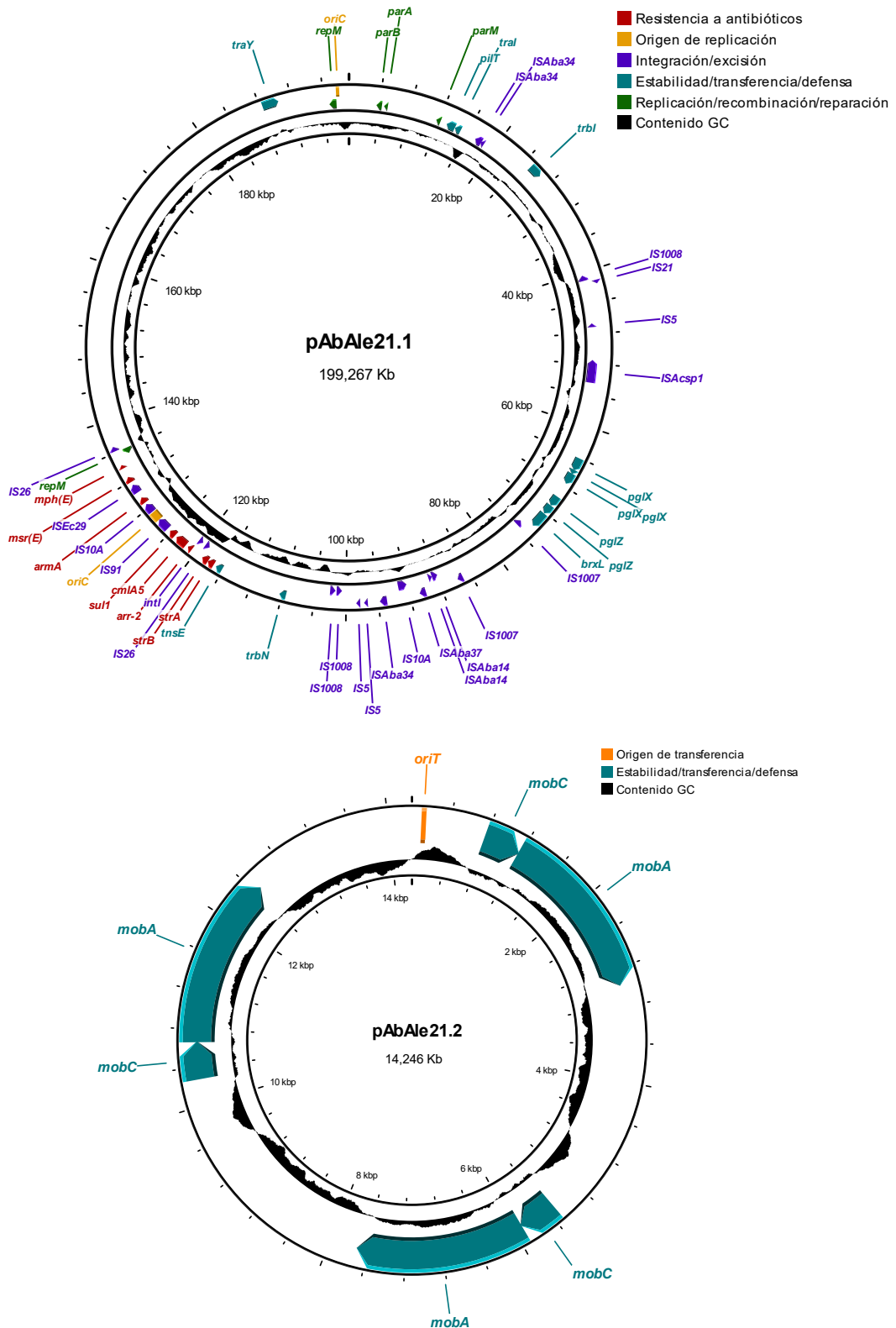


Figura 31. Plásmidos pAbAle21.1, pAbAle21.2, pAbAle21.3 y pAbAle21.4 identificados por secuenciación masiva en el aislamiento Ale21. Los genes están clasificados según su función en los diferentes colores indicados en la leyenda. Las flechas indican el sentido del gen.

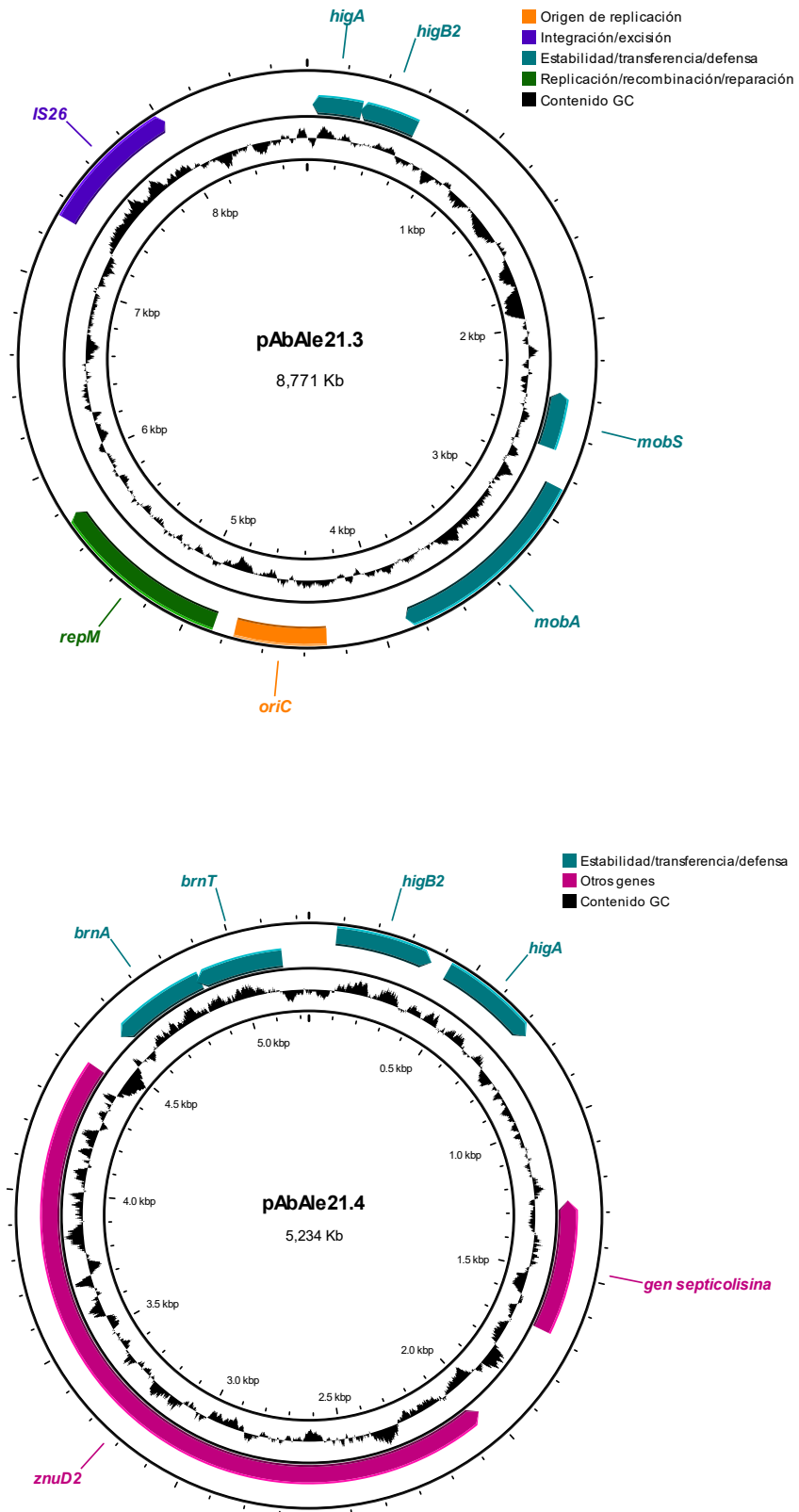


Figura 31. Continuación.

RESULTADOS

En el aislamiento Ale25 se identificaron tres plásmidos conjugativos de 240,879 Kb, 70,4 Kb y 22,3 Kb, y un pequeño plásmido no conjugativo de 2,740 Kb (Figura 32). Los genes *bla*_{PER-7}, *armA*, *sul1*, *sul2*, *strA*, *strB*, *tet(B)*, *mph(E)*, *msr(E)*, *cmlA5* y *arr-2* se localizaron en el plásmido de 240,879 Kb, mientras que el resto de genes se encontraban en el cromosoma. Además de los genes de resistencia, el plásmido pAbAle25.1 también portaba el gen de resistencia a antisépticos *qacEΔ1*.

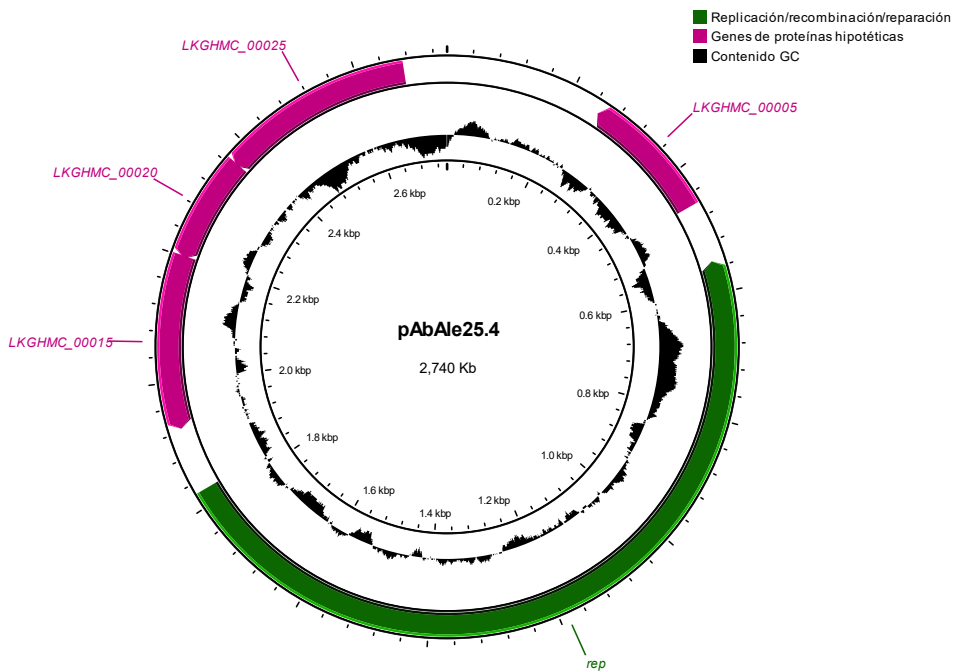
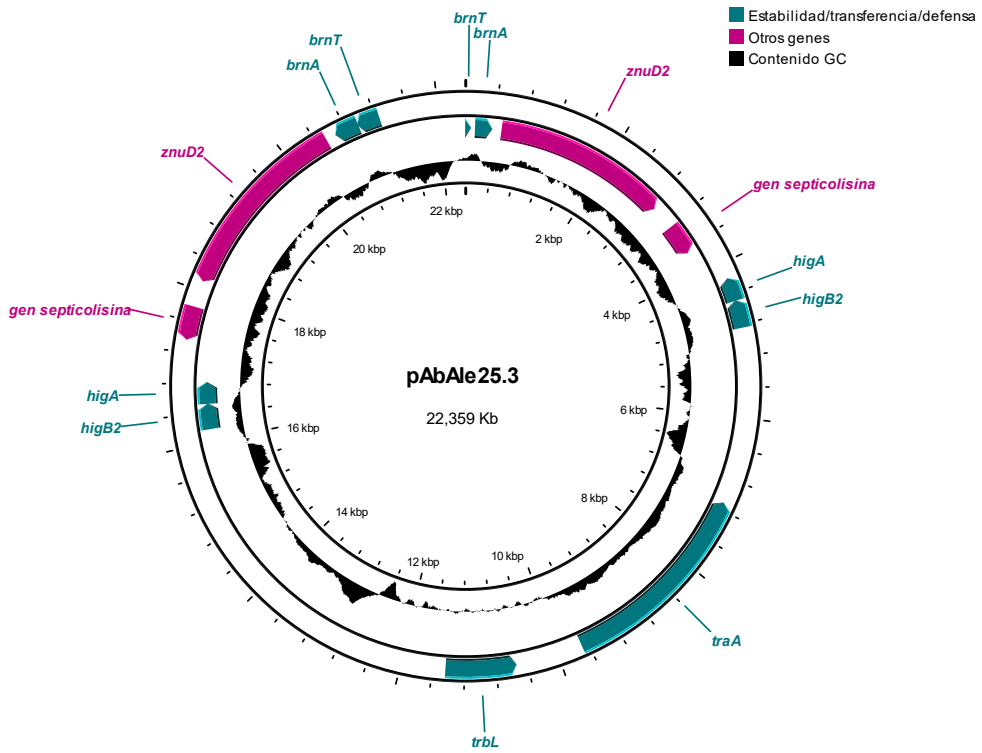


Figura 32. Continuación

En el aislamiento Ale26 se identificó un plásmido conjugativo de 96,763 Kb y uno no movilizable de 4,955 Kb (Figura 33). Los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{GES-35}, *sul1*, *aph(3')-VIa*, *aac(6')-Ib* y *dfrA7* se localizaron en el plásmido conjugativo. El resto de genes y una segunda copia de los genes *aac(6')-Ib* y *sul1* se localizaron en el cromosoma. Además de los genes de resistencia, el plásmido pAbAle26.1 también contenía el gen de resistencia a antisépticos *qacEΔ1*.

RESULTADOS

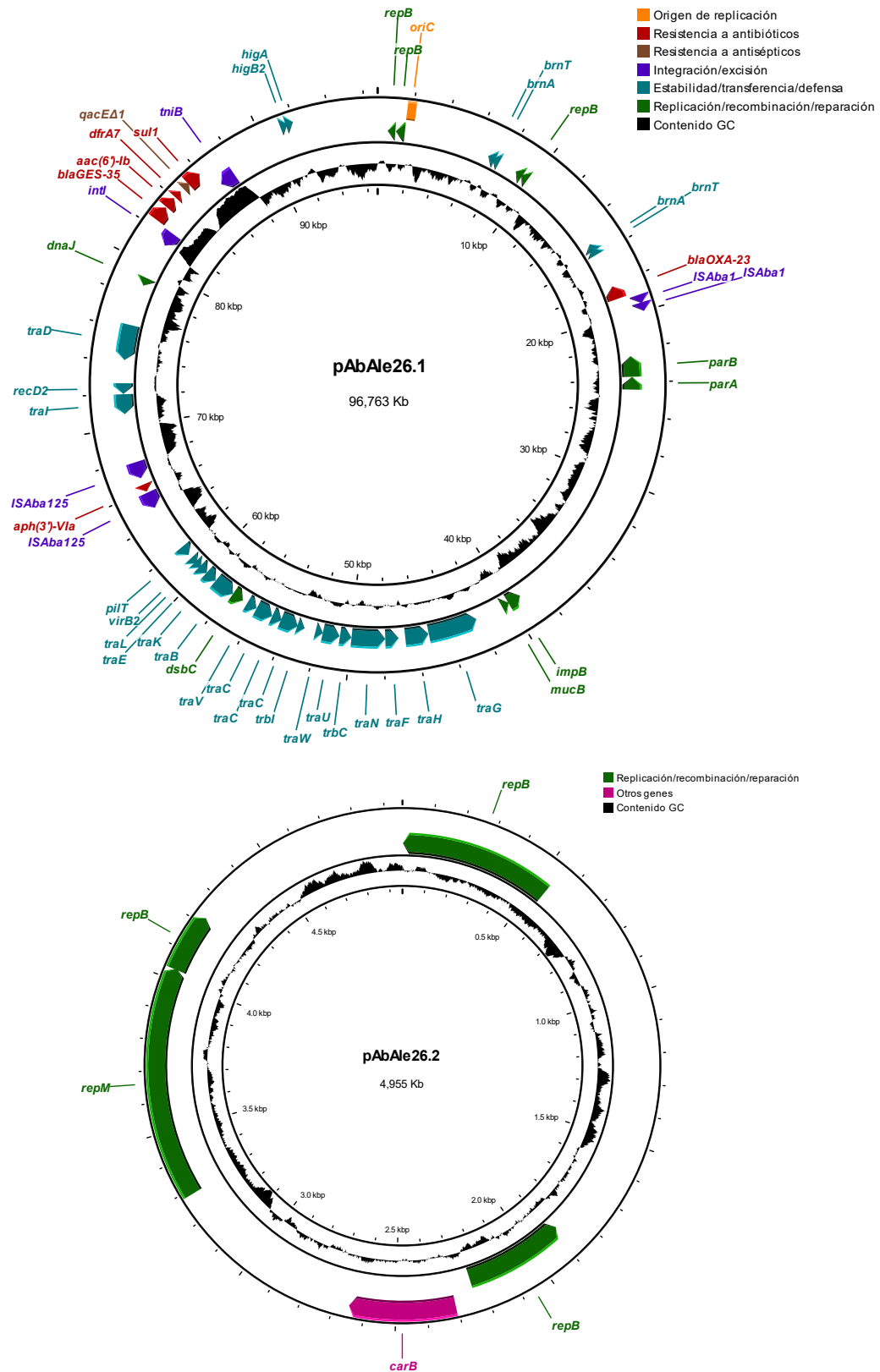


Figura 33. Plásmidos pAbAle26.1 y pAbAle26.2 identificados por secuenciación masiva en el aislamiento Ale26. Los genes están clasificados según su función en los diferentes colores indicados en la leyenda. Las flechas indican el sentido del gen.



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Desde que en la década de los ochenta *A. baumannii* comenzara a ganar importancia clínica, esta bacteria ha evolucionado hasta convertirse en la amenaza para la salud global que es hoy. Los aislamientos multirresistentes y, especialmente, los resistentes a carbapenems, son cada vez más frecuentes en todo el mundo. La aparición y diseminación de aislamientos resistentes es especialmente preocupante en aquellos países donde coinciden multitud de factores como: el uso inapropiado de antibióticos tanto en población humana como animal, la ausencia de medidas de prevención de las infecciones y/o la falta de regulación con respecto al uso de estos fármacos (126, 127). Un ejemplo de ello, entre otros, son los países de Oriente Medio y el Norte de África, y más concretamente, Egipto, donde, además, no se cuenta con mucha información sobre el nivel de resistencia.

En este estudio, en primer lugar, se analizaron las tasas de resistencia a antibióticos de un total de treinta y seis aislamientos de *A. baumannii* obtenidos de hospitales de Alejandría, en Egipto. De ellos, un 77,78% de los aislamientos resultaron ser de la categoría XDR, un porcentaje superior al detectado por otros autores en Egipto (73%), Libia (61,2%), Irak (63%), Arabia Saudita (37%) o Irán (16,1%), pero menor al publicado por otros autores en Líbano (95%) o en Assiut, Egipto (91,7%) (128, 129, 130, 131, 132, 133, 134).

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos revelaron una tasa de resistencia a carbapenems del 94,4%, a fluoroquinolonas del 100% y un 86,11% a aminoglicósidos. Aunque hay disparidad en la resistencia a carbapenems de los aislamientos de *A. baumannii* en Egipto, con cifras que se sitúan entre el 30 y el 100%, nuestros resultados coinciden con las cifras más altas (127, 135). Los datos de resistencia a carbapenems obtenidos en este estudio son superiores a los datos de algunos países europeos del Área del Mediterráneo como España (57%) o Italia (87%), y similares a los de

DISCUSIÓN

Chipre (92%), Grecia (97%) y Croacia (99,5%) (90). En cuanto a la tasa de resistencia a fluoroquinolonas observada en este trabajo, esta fue superior a la publicada en 2021 en todos los países europeos del Área del Mediterráneo, superando incluso a Croacia (99,8%) (90). Nuestros aislamientos también mostraron tasas de resistencia a aminoglicósidos superiores a las encontradas en estudios recientes de Egipto, más concretamente, en Ismailia (67%) y en Alejandría (82%) (136, 137). Si se compara la resistencia a aminoglicósidos de estos aislamientos con la publicada en los países del Sur de Europa, observamos que es superior a la encontrada en España (58%) e Italia (85%), pero inferior a la encontrada en Chipre (90%), Grecia (91%) y Croacia (99%) (90).

Cabe destacar que ocho de los aislamientos estudiados fueron resistentes a cefiderocol, una cefalosporina con sideróforo recientemente desarrollada como nueva alternativa terapéutica para este tipo de infecciones resistentes a los tratamientos habituales. Hasta la fecha, no se han descrito más aislamientos de *A. baumannii* resistentes a cefiderocol en Egipto a parte de los incluidos en este estudio. Afortunadamente, ninguno de los aislamientos fue resistente a colistina, dato que difiere significativamente respecto a la literatura reciente, donde los aislamientos egipcios alcanzan tasas de resistencia de hasta el 53% (138, 139).

El análisis mediante MLST y cgMLST de los genomas secuenciados por secuenciación masiva reveló que diecisiete aislamientos (47,2%) pertenecían al clon IC2, uno de los clones internacionales más frecuentemente descritos en Egipto (80). Dentro de los aislamientos pertenecientes al clon, el ST570 fue el linaje más abundante, un ST que según las entradas en PubMLST, estaría circulando en el país desde al menos 2017, ya que en ese año se encontraron tres aislamientos en Egipto. El siguiente linaje más abundante entre nuestros aislamientos fue el ST2, linaje del cual encontramos 1319 aislamientos en PubMLST (140), de los cuales dos fueron identificados en Egipto entre 2013 y 2015 y ocho en Jordania entre 2019 y 2020. Además, un

estudio reciente en el que se estudiaba la epidemiología de aislamientos del Norte de África y Medio Oriente, mostró cepas de origen sirio pertenecientes al ST2 (87). Estos datos confirman el hecho de que este linaje circula habitualmente entre países del Área del Mediterráneo. Por último, el linaje menos abundante fue el ST600, del cual encontramos cinco aislamientos en PubMLST recuperados en Jordania y Libia entre 2014 y 2020 (140), lo que sugiere una posible transmisión desde estos países vecinos. Aunque en este estudio el linaje ST570 fue el mayoritario, un estudio multicéntrico llevado a cabo en El Cairo identificó el ST2 como el linaje mayoritario, seguido del ST570 y en menor medida, el ST600 (82). En países vecinos como Sudan o Líbano, el ST2 es también el clon mayoritario (84, 86, 141).

En cuanto al clon IC4, este predomina en países de Latinoamérica, pero también ha sido descrito en países del Área del Mediterráneo como España y Turquía (79, 142). En este estudio tres aislamientos fueron asignados al ST15 siguiendo el esquema Pasteur, linaje que ya circula en Turquía desde al menos 2003 según PubMLST (140), y en Kuwait desde 2011 (143). Además, según el esquema Oxford, dos de estos aislamientos se asignaron al ST236, linaje que ha sido identificado desde 2015, sobre todo en Arabia Saudita, pero también en Egipto (81, 144). El aislamiento restante fue asignado al ST104, que no ha sido descrito antes en Egipto ni en ninguno de los países vecinos.

Diez aislamientos se relacionaron al clon IC5, al cual pertenece el ST158 del esquema Pasteur. Un clon que, aunque es considerado el clon Pan-Americano por excelencia, en los últimos años se ha encontrado en países del Área del Mediterráneo y Oriente Medio como, Irak, Turquía y Egipto según los datos consultados en PubMLST (140). Además, una revisión publicada en 2020, evidenció que una gran parte de los aislamientos obtenidos en Egipto pertenecían al ST158 (126). Según el esquema Oxford, solo se pudieron asignar cuatro aislamientos al ST499, un ST que ha sido identificado tanto en Egipto como en Arabia Saudita y Kuwait (145, 146, 147).

Un único aislamiento fue asignado al clon IC7, más concretamente los ST113 según el esquema Pasteur y ST2246 siguiendo el esquema Oxford. Los aislamientos pertenecientes a este clon se aíslan principalmente en Sudamérica, y especialmente en Bolivia y Uruguay (79, 148), sin embargo, se han descrito aislamientos de estos linajes en Egipto recientemente. Se identificaron cuatro aislamientos de los ST113 y ST2246 aislados en 2018 (141), y cuatro aislamientos del ST113 aislados en 2018 y 2020, siendo dos del ST2246 (85).

En cuanto al clon IC8, nos encontramos un aislamiento de los ST613 y ST1158 de los esquemas Pasteur y Oxford, respectivamente. Este linaje tiene una escasa presencia tanto en el Norte de África como en el Medio Oriente, de hecho, solo se ha descrito un único aislamiento en 2013 en Egipto, más concretamente en Alejandría, según PubMLST (140).

Tres aislamientos fueron relacionados al clon IC9, y asignados al ST85 y ST1580 de los esquemas Pasteur y Oxford, respectivamente. Este clon es especialmente frecuente en los países del Norte de África y el Medio Oriente, como Túnez, Libia, Egipto, Sudán, Líbano (pacientes sirios) y Arabia Saudita (84, 85, 87, 149, 150, 151). Además, una búsqueda en PubMLST arrojó cuatro resultados de aislamientos en Jordania en 2020 (140). En los últimos años también se han descrito aislamientos del clon en países Europeos del Área del Mediterráneo como España e Italia (79, 92, 152).

Finalmente nos encontramos con un aislamiento que fue asignado al ST164 por el esquema Pasteur y al ST1418 por el esquema Oxford, y considerado en un principio aislamiento sin relación clonal aparente o *singleton*. Sin embargo, el linaje ST164 coincide con el ST del nuevo clon IC11, recientemente descrito y propuesto en Dinamarca (77). Este linaje tiene 2145 alelos de diferencia respecto al IC7 según nuestros resultados de cgMLST. Aislamientos asignados al ST164 ya habían sido identificados en 2016 y 2017 en países del Área del Mediterráneo como Turquía y Francia,

según PubMLST (140), y en Alemania en 2021 (153). Hasta la fecha solo se ha descrito un aislamiento perteneciente a este linaje en Egipto, más concretamente en El Cairo (154).

El análisis del viruloma reveló el gran potencial patogénico de los aislamientos de Alejandría. Entre los genes identificados, la gran mayoría estaban involucrados en la formación de *biofilm*, considerado uno de los factores de virulencia claves para la supervivencia en el ambiente clínico y la invasión del huésped (155).

Los datos de producción de *biofilm* en otros estudios, muestran que entre el 50 y 70% de los aislamientos son productores de *biofilm*, y que los aislamientos de pacientes ingresados en UCI, suelen ser grandes productores (129, 156, 157). En este estudio, un 80% de los aislamientos producían *biofilm*, un dato superior a lo descrito en la bibliografía. En los aislamientos estudiados se identificaron los pili Csu, el sistema BfmRS, las proteínas Bap, el polisacárido extracelular PNAG, la proteína de membrana externa OmpA, el transportador Ata y las proteínas Abal y AbaR que según la literatura reciente son factores importantes para la producción de *biofilm* (2, 38, 129). Teniendo en cuenta esto, cabría esperar que en aquellos aislamientos donde haya ausencia de alguno de estos factores se observaran diferencias en la producción de *biofilm*, sin embargo, en este estudio no se pudo establecer una correlación entre los genes presentes en los aislamientos y la capacidad productora de *biofilm*, como han podido comprobar otros autores (158). A modo de ejemplo, los aislamientos del clon IC4 tenían todos los genes implicados en la producción de *biofilm*, sin embargo, mostraron una menor capacidad productora de *biofilm* que el aislamiento Ale30, al que le faltaba el gen *csuA*. Sería interesante en un futuro evaluar la importancia de estos factores realizando estudios de expresión con mutantes para determinar cuáles de estos factores están siendo determinantes en la formación de *biofilm* de cada aislamiento.

DISCUSIÓN

El gen *bap*, uno de los más importantes y necesario para la formación del *biofilm*, se encontró en todos los clones, un porcentaje superior al encontrado por otros autores en Egipto (13,8%), y en otros países como Irán (97,7%, 92% y 14.2%) o Irak (79,2%) (129, 158, 159, 160, 161).

El operón *csuA/BABCDE*, responsable de la producción de fimbrias, parece ser importante para la adhesión inicial a la superficie en el comienzo de la formación del *biofilm*, y está regulado por las proteínas BfmR y BfmS, las cuales estabilizan la transcripción de *csuC* y *csuE* (162). En este trabajo, únicamente los aislamientos de los clones IC4 e IC7 tenían todos los genes que componen el operón, aunque todos los aislamientos tenían los genes reguladores *bfmR* y *bfmS*, responsables del aumento de expresión de los genes de fimbrias (163, 164). Aunque es frecuente encontrar todos los genes del operón en la mayoría de los aislamientos descritos, algunas cepas clínicas han perdido estos genes (162).

También fueron encontrados en todos los aislamientos los genes que codifican la bomba de eflujo AdeFGH, que además de estar implicada en la resistencia a antibióticos, también juega un papel importante en la formación de *biofilm* mediante el transporte de moléculas autoinductoras (165).

El gen *ata*, que codifica el *Acinetobacter trimeric autotransporter* y que está implicado tanto en la adhesión y en la formación de *biofilm* como en la evasión del sistema inmune, se ha identificado en el 78% de los aislamientos de *A. baumannii* secuenciados (166), siendo similar a los resultados observados en este trabajo, donde todos los aislamientos excepto cinco tenían el gen.

Durante la formación de *biofilm*, las células bacterianas producen sustancias extracelulares que componen la matriz del *biofilm*, y una de estas sustancias son las poli- β -1,6-N-acetilglucosaminas las cuales están codificadas por los genes *pgaA*, *pgaB*, *pgaC* y *pgaD* (167). Estos genes se

encontraron en todos los aislamientos excepto en aquellos pertenecientes al IC9, donde el gen *pgaD* estaba ausente, y que al parecer no influyó en la capacidad de producción de *biofilm* respecto a otros aislamientos que sí contenían el gen.

Otro factor importante para la supervivencia dentro del huésped y la formación de *biofilm* que ofrece protección frente a la sequedad o frente a algunos antimicrobianos, es la cápsula (168). Los genes *ptk*, necesarios para la polimerización de la cápsula, se encontraron en todos los aislamientos. La presencia de este gen junto con el resto de genes implicados en la formación de *biofilm* explicaría el fenotipo tanto de virulencia como de resistencia observado en la mayoría de aislamientos de Alejandría.

La proteína OmpA, porina cuya función patogénica principal es la inducción de la apoptosis celular, también está muy relacionada con la formación de *biofilm* y está implicada en la evasión del sistema inmune favoreciendo la supervivencia en el huésped (169). Los genes que codifican esta proteína fueron encontrados en todos los clones, a diferencia de lo descrito por otros autores en Egipto, que encuentran una prevalencia del 63,8% (129). Sin embargo, en otros países del Medio Oriente como Irán o Irak, se obtuvieron resultados similares (100% y 92.45%, respectivamente) a los de este estudio (158, 161).

La expresión de los genes de *quorum sensing*, *abal* y *abaR*, es importante para la formación de *biofilm* más robustos (167). El gen *abal*, fue identificado en todos los clones excepto en el IC2, mientras que en los aislamientos pertenecientes al clon IC5 no se encontraron los genes *abaR* y *abal*. Esto explicaría la menor producción de *biofilm* en los aislamientos del clon IC5, aunque no explica los resultados obtenidos en los aislamientos del clon IC2, sugiriendo que otros factores deben estar influyendo en la capacidad de producción de estos aislamientos.

Asimismo, se identificaron genes que codifican los pili tipo IV, implicados en la adherencia celular, formación de *biofilm* y motilidad. Entre estos genes, *pilA*, *pilH*, *pilT* y *pilU* son los principales implicados en la motilidad. En este estudio, los genes *pilH*, *pilT* y *pilU* fueron identificados en todos los aislamientos. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores, que identificaron los genes *pilH*, *pilT* y *pilU* en el 91.4%, 92.9% y 95.7% de los aislamientos (170). El gen *pilA*, sin embargo, se identificó solo en el 11,1% de los aislamientos, lo que difiere respecto al 78,6% encontrado por Al-Shamiri y colaboradores (170). La motilidad está estrechamente relacionada con la virulencia en *Acinetobacter baumannii* (6). Las bacterias que presentan *surface-associated motility* necesitan los pili tipo IV, los lipopolisacáridos, proteínas de *quorum sensing* BfmR y BfmS, y disponibilidad de hierro. Además, parece que la proteína OmpA también está relacionada con la capacidad de motilidad (2, 38, 171). La presencia de los genes que codifican para estos factores y sus interacciones en los aislamientos, explicaría por qué prácticamente todos muestran motilidad asociada a superficie.

El lipopolisacárido es uno de los componentes de la membrana externa, y un factor importante implicado en la supervivencia de *A. baumannii* dentro del huésped (46). Entre los genes implicados en la producción del lipopolisacárido se encuentran los genes *lpxA*, *lpxB*, *lpxC*, *lpxD*, *lpxL* y *lpxM*, que codifican el lípido A, y el gen *lpsB*. En todos los aislamientos se identificaron estos genes, a excepción de los aislamientos del clon IC5, en los que no se identificó el gen *lpxM*. Se han descrito alteraciones en la estructura del lípido A por mutaciones o ausencia de alguno de estos genes que pueden producir resistencia a polimixinas (46), sin embargo, en los aislamientos de Alejandría no se observó dicho fenómeno.

Aunque las PBP suelen estar relacionadas con la resistencia a antibióticos, las PBP7/8, codificadas en el gen *pbpG* se consideran un factor de virulencia ya que aumentan la supervivencia de *A. baumannii* en el

huésped. La presencia de este gen en todos los aislamientos incluidos en este trabajo implica que estos aislamientos presumiblemente serían menos susceptibles a las defensas del huésped (46).

Por otro lado, en todos los aislamientos se encontraron genes que codifican los sistemas de secreción tipo II y tipo VI. El primero se encuentra en la mayoría de genomas, y es el encargado de secretar diferentes enzimas y toxinas implicadas en la supervivencia en el ambiente y en la invasión de las células del huésped (172). La proteína CpaA, también es secretada por este sistema, y según la literatura está bastante conservada en la mayoría de aislamientos clínicos (172), sin embargo, en este trabajo solo se identificó en los aislamientos de los clones IC8 e IC9. En cuanto al sistema de secreción tipo VI, se trata de un mecanismo de defensa mediante el cual se secretan toxinas frente a otros microorganismos competidores o frente a la célula huésped (172). En 2022, Jun-Fang Dong y colaboradores identificaron este sistema en el 66,2% de los aislamientos (173), dato visiblemente inferior al observado en este trabajo. Además, en todos los aislamientos se identificaron los genes de fosfolipasas *plc1*, *plc2* y *plcD*, enzimas que degradan la fosfatidilcolina de la membrana de la célula huésped para facilitar su invasión (174). Finalmente, en todos los aislamientos se identificaron los genes que codifican acinetobactinas, los sideróforos más importantes en *A. baumannii* involucrados en la captación de metales (169).

El análisis de los genes implicados en la resistencia a los antibióticos reveló que los genes *bla*_{OXA-66} y *bla*_{OXA-65} fueron las variantes del gen *bla*_{OXA-51-like} más comúnmente encontradas entre los aislamientos de Alejandría. Estos resultados son consistentes con lo publicado en los países del Norte de África y el Medio Oriente, donde se observa una alta prevalencia del gen *bla*_{OXA-66} (175). En Egipto, varios autores encontraron diferentes escenarios, Al-Hassan, Hamed y colaboradores concluyeron que la variante *bla*_{OXA-66} era la mayoritaria entre sus aislamientos, mientras que Fam y colaboradores describieron una mayor incidencia de la variante *bla*_{OXA-65} (82, 83, 139). La

variante *bla*_{OXA-51}, que ha sido minoritaria en este estudio, ha sido identificada con mayor frecuencia en Egipto durante los últimos años (126). Los genes *bla*_{OXA-64}, *bla*_{OXA-68}, *bla*_{OXA-91} y *bla*_{OXA-94} se describen con menos frecuencia en Egipto, coincidiendo con nuestros resultados (82, 83, 126). En cuanto al contexto genético de estos genes, fue similar a lo descrito por otros autores, aunque se suelen encontrar secuencias de inserción *ISAba1 upstream* estos genes, no todas las variantes la tienen (176).

Los genes *bla*_{OXA-23} se encontraron en un 94,4% de los aislamientos, una incidencia superior a la encontrada por otros autores en Egipto: Tanta (60,8%), Asiut (68,3%), El Cairo (69,6% y 77,7%); y similar a la descrita en los países del Consejo de Cooperación para los Estados Árabes del Golfo (94%), aunque inferior a la observada por Abouelfetouh en Alejandría, Egipto (100%) (80, 82, 83, 134, 147, 177). Cabe destacar que de los aislamientos que se secuenciaron con MinION, tres aislamientos contenían una segunda copia del gen *bla*_{OXA-23} o sus variantes, fenómeno que se ha descrito previamente en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* en China, pero que no implicó un aumento de la resistencia a carbapenems (178). Las variantes de estos genes fueron localizadas dentro de los transposones Tn2006 y Tn2008, una localización frecuente para estos genes según la literatura, y que es responsable de la sobreexpresión del gen y su movilización (179).

Un 27,78% de los aislamientos portaban el gen de carbapenemasa *bla*_{NDM-1}, en línea con lo descrito en los últimos años entre los aislamientos egipcios con incidencias del 39,3%, 23%, 21,7% y 11,7% (80, 82, 83, 127). Todos los genes *bla*_{NDM-1} estaban dentro de la isoforma del transposón Tn 125 (Δ Tn125) en nuestros aislamientos, con la secuencia de inserción *ISAba125 upstream* del gen, una estructura que aumentaría la expresión de esta carbapenemasa (180).

Los genes *bla*_{GES} se describen cada vez con mayor frecuencia en los países del Área del Mediterráneo y el Medio Oriente como Túnez, Turquía o Kuwait (181, 182, 183). Un total de nueve aislamientos de Alejandría (25%) tenían genes *bla*_{GES}, la mitad de la frecuencia encontrada por otros autores en Egipto (50%) (184). Algunos de estos genes pueden tener incluso actividad carbapenemasa, aunque no es el caso de las variantes encontradas en este trabajo (181). En todos los aislamientos, estos genes se encontraron dentro de un integrón de clase 1 ya descrito en otros aislamientos de Pakistán o Kuwait, junto con otros genes de resistencia como *dfrA7*, *sul1* y *aac(6')-Ib* (145, 185).

Los genes *bla*_{PER-7} fueron identificados en el 11,11% de los aislamientos. No es un gen comúnmente descrito en Egipto, el dato más reciente lo publicaron Jalal y colaboradores, siendo identificado en el 9,7% de sus aislamientos (141). Un estudio anterior publicado en 2014 describió una prevalencia del 55% (186). En nuestros aislamientos, este gen estaba codificado dentro de una estructura que conecta un elemento *ISCR1* con un integrón de clase 1. Esta construcción se ha descrito previamente asociada a bacterias con fenotipos multirresistentes (187). Teniendo en cuenta la identificación de ocho aislamientos resistentes a cefiderocol entre los aislamientos de este estudio, es importante mencionar que tanto los genes *bla*_{NDM} como los genes *bla*_{PER} parecen tener un papel importante la reducción de la susceptibilidad a cefiderocol, un nuevo antibiótico de la familia de las cefalosporinas recientemente aprobado como última alternativa terapéutica (188, 189).

En cuanto a los genes de cefalosporinasas, es frecuente encontrar múltiples variantes de los genes *bla*_{ADC} entre los aislamientos egipcios. La variante más frecuente entre los aislamientos estudiados fue *bla*_{ADC-73}, por delante de *bla*_{ADC-117}. La variante *bla*_{ADC-73} también fue la más frecuente entre los aislamientos descritos por Hamed y colaboradores (32,6%), sin embargo, la segunda más descrita fue la variante *bla*_{ADC-32}, a diferencia de lo observado

DISCUSIÓN

en nuestros aislamientos (82). Un 58,33% de los aislamientos tenían una secuencia de inserción *upstream* de los genes *bla_{ADC}*, coincidiendo con los resultados obtenidos por Hamed y colaboradores (56.5%) (82).

Un 41,7% de los aislamientos analizados portaban la variante *bla_{TEM-1}*, un porcentaje superior al publicado recientemente en Egipto (37%). Además, la secuencia de inserción IS26 fue identificada *upstream* del gen en cinco de estos aislamientos, una estructura que ya ha sido previamente descrita junto con el gen de resistencia a antibióticos *aac(3)-IIa* y una segunda IS26 (190). Esta secuencia de inserción podría estar presente también en el resto de aislamientos que contenían el gen, pero no se pudo comprobar porque el *contig* que se obtuvo en esos aislamientos fue demasiado corto.

Merece la pena destacar que todos los aislamientos tenían combinaciones de múltiples genes de β -lactamasas. Siendo especialmente preocupante el caso del aislamiento Ale25, que contiene cinco genes de β -lactamasas de cuatro clases diferentes. Según la literatura publicada, no se han descrito previamente aislamientos con estas características en Egipto. Este hallazgo, pone en evidencia el peligro que supone la diseminación de este tipo de aislamientos.

Entre los genes de resistencia adicionales, destacaron los genes de resistencia a aminoglicósidos *aph(3')-VI* y *ant(3'')-II* identificados en el 83,3% de aislamientos, y los genes *armA* y *aph(3')-Ia*, identificados en el 72,2% y 58,3% de los aislamientos, respectivamente. Estos resultados son especialmente alarmantes, comparándolos con otros estudios del país en los que se describe una elevada prevalencia de estos genes aunque con tasas del gen *aph(3')-VI* menores (31.4%) (137, 191). También fue especialmente frecuente el gen de resistencia a sulfonamidas *sul1* (66,7%), aunque no tanto como lo indicado por Jalal y colaboradores (84%) (141).

Además de los genes de resistencia específicos de cada familia de antibióticos, hubo una gran prevalencia de genes que codifican bombas de eflujo en los aislamientos. Las bombas de eflujo de la superfamilia RND son especialmente prevalentes en *A. baumannii* (141). Dado que estas bombas de eflujo pueden transportar una amplia gama de sustratos, son importantes determinantes de resistencia a muchos antibióticos diferentes.

Un aspecto muy preocupante, es la diseminación de la resistencia mediante elementos genéticos móviles, entre los que se encuentran los plásmidos. En *Acinetobacter spp.* se han descrito plásmidos desde 1,3 Kb hasta 400 Kb, sin embargo, los plásmidos de menos de 20 Kb son especialmente numerosos y suelen ser movilizables o no transmisibles (65, 192). Las extracciones de plásmidos por lisis convencional mostraron plásmidos en treinta y tres aislamientos de tamaños comprendidos entre 1,5 y 44,1 Kb. El aislamiento con menos plásmidos detectados tenía un único plásmido, mientras que en el aislamiento que más tenía se detectaron ocho. La comparación de los perfiles plasmídicos entre los aislamientos, reveló patrones similares entre los aislamientos pertenecientes al mismo clon, aunque se observaron variaciones en algunos aislamientos. Los resultados que obtuvimos por la técnica S1-PFGE nos mostraron la presencia de plásmidos de mayor tamaño comprendidos entre 194 y 237 Kb. Este tipo de plásmidos, son especialmente interesantes ya que suelen codificar múltiples genes de resistencia y elementos móviles (65).

En cuanto a los plásmidos identificados, la búsqueda e identificación de las variantes de los genes de replicasas nos permite clasificarlos y establecer relaciones de incompatibilidad entre ellos. Aquellos plásmidos estrechamente relacionados no pueden coexistir en la misma célula, debido a que comparten el mismo sistema de replicación y, por lo tanto, forman parte del mismo grupo de incompatibilidad (60). La posibilidad de que plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad coexistan en la misma célula y que estos acumulen diferentes genes de resistencia, es clave para el desarrollo de

fenotipos altamente resistentes (193). En este trabajo, la clasificación de los plásmidos mediante la identificación de las replicasas por dos metodologías diferentes ofreció resultados complementarios. Mientras que mediante el método por PCR descrito por Bertini y colaboradores (66) se obtuvo una primera aproximación de las replicasas en los aislamientos, cuando se secuenciaron los plásmidos de los siete aislamientos se obtuvieron resultados más específicos al compararlos con la base de datos *Acinetobacter Plasmid Typing database* (67).

En los aislamientos Ale10 y Ale20, donde en un inicio no se pudo diferenciar entre las replicasas Aci8/9 y Aci1/2, posteriormente se confirmó que concretamente se trataba de las replicasas Aci9 y Aci1, respectivamente. Además, otros grupos que no habían sido descritos en el esquema de Bertini, se pudieron identificar por el método de comparación de secuencias ya que su base de datos incluye un mayor número de replicasas que el esquema antiguo. Sin embargo, también se observaron discrepancias entre ambos métodos. En el aislamiento Ale9, el esquema de Bertini reveló dos replicasas Aci1/2 y p2S1, sin embargo, el método de Lam y colaboradores sólo identificó la replicasa R3-T60. Pasó algo similar en los aislamientos Ale21 y Ale26, donde no se pudieron identificar por el método de Lam y colaboradores las replicasas Aci4, Aci8/6 y p2S1. Sin embargo, cabe señalar que durante el proceso de ensamblado de algunos aislamientos se observaron *contigs* que no se pudieron ensamblar y que podrían pertenecer a plásmidos, explicando así la ausencia de las replicasas no detectadas. Con la información que tenemos en estos momentos, no es suficiente para descartar la presencia de más plásmidos, por lo que convendría repetir la secuenciación de esos aislamientos para intentar resolver posibles plásmidos adicionales. Además, en algunos aislamientos, se identificaron plásmidos que no se pudieron clasificar por el método de *replicon typing*, ya que este método está limitado por las secuencias incluidas en la base de datos de Lam y colaboradores, lo que puede indicar que estas sean replicasas no descritas hasta ahora.

Las replicasas más ampliamente distribuidas son Aci1 (R3-T1) y Aci6 (RP-T1) (67), sin embargo, los plásmidos identificados en este trabajo tenían en su mayoría replicasas Aci6, pero no replicasas Aci1. Los plásmidos RepAci6 suelen ser de más de 20 Kb y normalmente son conjugativos. Además, normalmente portan genes de resistencia a antibióticos como *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-23}*, *aph(3')-VI*, *sul1*, *sul2*, *mph(E)* y *msr(E)* (65, 193). Coincidiendo con la literatura, la mayoría de plásmidos de menos de 20 Kb pertenecían al grupo de la superfamilia Rep_3 y codificaban genes de partición, sistemas toxina/antitoxina, genes de captación de zinc y septicolisina (60, 65). Sin embargo, ninguno de estos plásmidos codificaba genes de resistencia a antibióticos.

Gracias a la secuenciación de los plásmidos de los aislamientos Ale9, Ale21 y Ale25, se pudo comprobar que los resultados obtenidos por S1-PFGE coincidían con lo observado en la secuenciación.

En cuanto a la localización genética de los genes de β -lactamasas, las hibridaciones con la sonda *bla_{NDM}* sugerían que estos genes se encontraban en el cromosoma en la mayoría de los aislamientos. Al menos en los aislamientos Ale20 y Ale25, se pudo confirmar mediante secuenciación que el gen estaba codificado en el cromosoma, siendo esta su localización más habitual (92, 152).

Las hibridaciones con la sonda del gen *bla_{PER}* mostraron una señal a la altura hasta la que migra el cromosoma bacteriano en una electroforesis convencional, lo que sugería su localización cromosómica. Sin embargo, los resultados de la secuenciación de plásmidos mostraron que estos genes se encontraban en plásmidos de aproximadamente 205 y 240 Kb en los aislamientos Ale9 y Ale25; y en el cromosoma en el aislamiento Ale10. El gen *bla_{PER-7}* ya se ha descrito con anterioridad en plásmidos de aproximadamente 200 Kb y 190 Kb en los Emiratos Árabes y en India, respectivamente, y acompañado de otros genes de resistencia a antibióticos como *strA*, *strB*,

DISCUSIÓN

armA, *mph(E)*, *msr(E)*, *cmlA1*, *arr-2*, *sul1*, *sul2* y *tet(B)* (176, 194). Los plásmidos identificados en India además tenían la replicasa R3-T60, coincidiendo con los plásmidos identificados en nuestros aislamientos con *bla*_{PER-7}.

Los experimentos de hibridación de los genes *bla*_{GES} también mostraron una señal a la altura hasta la que migra el cromosoma bacteriano en una electroforesis convencional, sugiriendo la localización cromosómica del gen. Además, en algunos aislamientos también se observó una señal adicional de aproximadamente 70 Kb, indicando que habría una segunda copia del gen localizada en un plásmido de ese tamaño. Sin embargo, la secuenciación de los aislamientos Ale18 y Ale26 demostró, que al menos en esos aislamientos, solo existía una copia del gen y que en ambos aislamientos se encontraba localizada en plásmidos de aproximadamente 80 y 96 Kb, respectivamente. Según la secuenciación de plásmidos, los genes *bla*_{OXA-23} se localizaron en el cromosoma en cinco aislamientos, y en plásmidos conjugativos de aproximadamente 80 y 96 Kb en dos aislamientos. Los genes *bla*_{GES-11} y *bla*_{OXA-23} ya se han descrito juntos previamente en plásmidos conjugativos de aproximadamente 80 Kb con replicasa Aci6 (RP-T1) en Kuwait (145). Estos además iban acompañados de otros genes de resistencia a antibióticos como *aacA4*, *dfrA7* y *sul1*. Cabe mencionar que el resto de aislamientos no secuenciados que contenían genes *bla*_{GES} también dieron positivo para la replicasa Aci6, por lo que podría ser que también estuvieran codificados en plásmidos similares.

Los resultados obtenidos en este estudio pusieron en evidencia los puntos fuertes y las limitaciones de cada técnica, las cuales ofrecían resultados diferentes y complementarios entre sí. Mientras que la lisis convencional es útil para una primera aproximación al perfil plasmídico y para la detección de plásmidos de bajo peso molecular, la técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* con endonucleasa S1 es muy útil y precisa para la detección de plásmidos de alto peso molecular. Sin embargo, no hay que

olvidar que la lisis convencional puede producir bandas adicionales producto de la fragmentación del cromosoma que pueden interpretarse erróneamente como plásmidos. Además, los plásmidos pueden estar en diferentes conformaciones, lo que puede producir bandas de diferentes tamaños en el gel de agarosa. Es importante destacar, además, que tanto la lisis convencional como la técnica de S1-PFGE están limitadas por la expresión de los plásmidos en el momento de la extracción o preparación de los datos del cultivo bacteriano, por lo que no siempre se pueden obtener las suficientes copias para ser detectados en el gel.

Según los resultados obtenidos, en mi opinión, ambas técnicas pueden ofrecer una primera aproximación cuando no es posible aplicar otras técnicas más costosas y que requieren de un elevado conocimiento en bioinformática, como la secuenciación. Sin embargo, el método más fiable actualmente sería la combinación de técnicas de secuenciación de lecturas largas y cortas para realizar ensamblados híbridos, la cual ha demostrado muy buenos resultados en la resolución de plásmidos (195). Sin embargo, esta técnica también tiene sus inconvenientes, y es que los ensamblados no siempre consiguen cerrar todos los plásmidos, por lo que no se puede descartar la presencia de plásmidos adicionales cuando hay *contigs* no ensamblados. En definitiva, para mejorar el número de estructuras que se pueden detectar y para obtener una visión completa y precisa del plasmidoma y la localización genética de los determinantes de resistencia a antibióticos, es necesario combinar diferentes técnicas.

En resumen, este trabajo ha puesto de manifiesto la capacidad virulenta de estos aislamientos, habiendo identificado una gran cantidad de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia codificados tanto en el cromosoma como en plásmidos conjugativos. La presencia de estos aislamientos en los hospitales egipcios, deja clara la necesidad de establecer medidas de prevención y de control de infecciones para evitar su diseminación no solo en el país, sino en la zona del Mediterráneo.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La gran mayoría de aislamientos obtenidos en los hospitales de Alejandría pertenecían a la categoría XDR, mostrando tasas especialmente altas de resistencia a β -lactámicos, incluyendo los carbapenems con un 94,4% de resistencia, aminoglicósidos y fluoroquinolonas. Más del 20% de aislamientos además eran resistentes a cefiderocol, un fenómeno nunca antes descrito en Egipto.
- Se encontró una gran diversidad clonal entre los aislamientos de Alejandría, siendo la mayoría de aislamientos de los clones IC2 e IC5. El resto, pertenecían a otros clones minoritarios en Egipto como el IC4, IC7, IC8 e IC9, y se identificó un aislamiento cuyo ST coincide con el del recientemente descrito clon IC11.
- Mediante secuenciación masiva se pudo estudiar el viruloma de los aislamientos estudiados, siendo este muy diverso. Este estaba compuesto principalmente por genes involucrados en la adherencia, producción de *biofilm*, evasión del sistema inmune y defensa frente a otros microorganismos competidores.
- Los aislamientos de Alejandría presentaron combinaciones desde un mínimo de tres genes de β -lactamasas, hasta un máximo de cinco. Entre estos genes se incluían variantes de los genes de carbapenemasas *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23}, *bla*_{NDM-1}; y genes de β -lactamasas *bla*_{GES-like}, *bla*_{PER-7}, *bla*_{TEM-1} y *bla*_{ADC-like}. Se observó una especial incidencia de los genes de carbapenemasas *bla*_{OXA-23} y *bla*_{NDM-1}. También se identificaron otros genes de β -lactamasas emergentes y genes de resistencia a aminoglicósidos, tetraciclinas, sulfonamidas, cloranfenicol, trimetoprima, macrólidos y rifampicina localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos, dejando en evidencia la gran plasticidad de estos aislamientos.

CONCLUSIONES

- El análisis de los entornos genéticos y de la localización de los genes de carbapenemasas y otros genes de β -lactamasas, mostró que los genes de carbapenemasas *bla*_{OXA-23} y *bla*_{NDM-1} estaban integrados en transposones Tn2006, Tn2008 y Δ Tn125; y en algunos casos localizados dentro de plásmidos conjugativos de gran tamaño. Además, los genes de β -lactamasas *bla*_{PER-7} y *bla*_{GES-like} se encontraron también dentro de integrones de clase 1, y en algunos casos codificados en plásmidos. Los genes *bla*_{ADC-like} y *bla*_{TEM-1} tenían secuencias de inserción *upstream* del gen en múltiples aislamientos. Esto pone de manifiesto la facilidad de estos aislamientos para adquirir y diseminar estos genes de resistencia a antibióticos.
- La secuenciación de los plásmidos de los siete aislamientos seleccionados, nos permitió obtener la secuencia completa y mapear un total de 15 plásmidos. Entre ellos, se identificaron plásmidos de gran tamaño de hasta 240 Kb con múltiples genes de resistencia a antibióticos y antisépticos, que además eran conjugativos y movilizables, lo que facilitaría su diseminación a otros aislamientos.
- Los resultados obtenidos en este trabajo, ponen en evidencia la necesidad de implementar medidas de control para evitar la diseminación de este tipo de aislamientos en los hospitales, no solo dentro del país, sino también a otros países del Área del Mediterráneo ocasionando un grave problema de salud pública.



REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Almasaudi SB. (2018). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J Biol Sci, 25(3):586-596.
2. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. Antibiotics, 9(3):119.
3. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. (2018). Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. Infect Drug Resist, 11:1249-1260.
4. Rebic V, Masic N, Teskeredzic S, Aljicevic M, Abduzaimovic A, Rebic D. (2018). The Importance of *Acinetobacter* Species in the Hospital Environment. Med Arch, 72(5):325-329.
5. Castanheira M, Mendes RE, Gales AC. (2023). Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. Clin Infect Dis, 76(Suppl 2):S166-S178.
6. Corral J, Pérez-Varela M, Sánchez-Osuna M, Cortés P, Barbé J, Aranda J. (2021). Importance of twitching and surface-associated motility in the virulence of *Acinetobacter baumannii*. Virulence, 12(1):2201-2213.
7. Baumann P. (1968). Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J Bacteriol, 96(1):39-42.
8. Nocera FP, Attili A, De Martino L. (2021). *Acinetobacter baumannii*: Its Clinical Significance in Human and Veterinary Medicine. Pathogens, 10(2):127.
9. Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. (2012). High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* isolates in Brazil. Int J Antimicrob Agents, 39(5):396-401.

REFERENCIAS

10. Li P, Yang C, Xie J, Liu N, Wang H, Zhang L, Wang X, Wang Y, Qiu S, Song H. (2015). *Acinetobacter calcoaceticus* from a fatal case of pneumonia harboring *bla*(NDM-1) on a widely distributed plasmid. *BMC Infect Dis*, 15:131.
11. Al Atrouni A, Joly-Guillou M, Hamze M, Kempf M. (2016). Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Front Microbiol*, 7:49.
12. Fernández-Cuenca F, Tomás M, Tormo N, Gimeno C, Bou G, Pascual Á. (2019). Reporting identification of *Acinetobacter* spp. genomic species: A nationwide proficiency study in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 37(2):89-92.
13. Bouvet PJ, Grimont PA. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 36(2):228-240.
14. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(3):538-582.
15. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. (2019). Accurate identification of clinically important *Acinetobacter spp.*: an update. *Future Sci OA*, 5(6):FSO395.
16. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. (2012). Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect*, 18(11):1097-1103.
17. Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, Dijkshoorn L. (1997). Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4):1179-1187.
18. Gerner-Smidt P. (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol*, 30(10):2680-2685.

19. Wang J, Ruan Z, Feng Y, Fu Y, Jiang Y, Wang H, Yu Y. (2014). Species Distribution of Clinical *Acinetobacter* Isolates Revealed by Different Identification Techniques. Plos One, 9(8):e104882.
20. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. (2010). *gyrB* Multiplex PCR To Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Genomic Species 3*. J Clin Microbiol, 48(12):4592-4594.
21. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *blaOXA-51*-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol, 44(8):2974-2976.
22. Lee Y, Turton JF, Chen T, Wu RC, Chang W, Fung C, Chen C, Cho W, Huang L, Siu LK. (2009). First Identification of *blaOXA-51*-like in Non-*baumannii* *Acinetobacter spp.* J Chemother, 21(5):514-520.
23. Lee I, Ouk Kim Y, Park S, Chun J. (2016). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol, 66(2):1100-1103.
24. Joyanes P, del Carmen Conejo M, Martínez-Martínez L, Perea EJ. (2001). Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. J Clin Microbiol, 39(9):3247-3253.
25. Marí-Almirall M, Cosgaya C, Higgins PG, Van Assche A, Telli M, Huys G, Lievens B, Seifert H, Dijkshoorn L, Roca I, Vila J. (2017). MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. Clin Microbiol Infect, 23(3):210.e1-210.e9.
26. Vázquez-López R, Solano-Gálvez SG, Juárez Vignon-Whaley JJ, Abello Vaamonde JA, Padró Alonzo LA, Rivera Reséndiz A, Muleiro Álvarez M, Vega López EN, Franyuti-Kelly G, Álvarez-Hernández DA, Moncaleano Guzmán V, Juárez Bañuelos JE, Marcos Felix J, González Barrios JA, Barrientos Fortes T.

REFERENCIAS

- (2020). *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics*, 9(4):205.
27. Metan G, Zarakolu P, Otlu B, Tekin İ, Aytaç H, Bölek EÇ, Metin BC, Arsava EM, Ünal S. (2020). Emergence of colistin and carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (CCR-Acb) complex in a neurological intensive care unit followed by successful control of the outbreak. *J Infect Public Health*, 13(4):564-570.
28. Thadtapong N, Chaturongakul S, Soodvilai S, Dubbs P. (2021). Colistin and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Aci46 in Thailand: Genome Analysis and Antibiotic Resistance Profiling. *Antibiotics*, 10(9):1054.
29. Ahsan U, Mushtaq F, Saleem S, Malik A, Sarfaraz H, Shahzad M, Uhlin BE, Ahmad I. (2022). Emergence of high colistin resistance in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Pakistan and its potential management through immunomodulatory effect of an extract from *Saussurea lappa*. *Front Pharmacol*, 13:986802.
30. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, WHO Pathogens Priority List Working Group. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18(3):318-327.
31. Freire MP, de Oliveira Garcia D, Garcia CP, Campagnari Bueno MF, Camargo CH, Kono Magri, A S G, Francisco GR, Reghini R, Vieira MF, Ibrahim KY, Rossi F, Hajjar L, Levin AS, Hoff PM, Pierrotti LC, Abdala E. (2016). Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clin Microbiol Infect*, 22(4):352-358.

32. Tsitsopoulos PP, Iosifidis E, Antachopoulos C, Anestis DM, Karantani E, Karyoti A, Papaevangelou G, Kyriazidis E, Roilides E, Tsonidis C. (2016). Nosocomial bloodstream infections in neurosurgery: a 10-year analysis in a center with high antimicrobial drug-resistance prevalence. *Acta Neurochir*, 158(9):1647-1654.
33. Gong YL, Yang ZC, Yin SP, Liu MX, Zhang C, Luo XQ, Peng YZ. (2016). Analysis of the pathogenic characteristics of 162 severely burned patients with bloodstream infection. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 32(9):529-535.
34. Kanafani Z, Kanj S. (2015). *Acinetobacter* infection: Treatment and prevention. UpToDate. Recuperado el 28 de julio de 2023. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/Acinetobacter-infection-treatment-and-prevention>.
35. Arnone N, Chidchamai K, Da-oh Hudadini, Sirithorn S, Aranya K, Surathinee K, Wren Brendan W, Stabler Richard A, Brown Jeremy S, Ganjana L. (2022). *Acinetobacter nosocomialis* Causes as Severe Disease as *Acinetobacter baumannii* in Northeast Thailand: Underestimated Role of *A. nosocomialis* in Infection. *Microbiol Spectr*, 10(6):2836.
36. Kiyasu Y, Hitomi S, Funayama Y, Saito K, Ishikawa H. (2020). Characteristics of invasive *Acinetobacter* infection: A multicenter investigation with molecular identification of causative organisms. *J Infect Chemother*, 26(5):475-482.
37. Yang L, Dong N, Xu C, Ye L, Chen S. (2021). Emergence of ST63 Pandrug-Resistant *Acinetobacter pittii* Isolated From an AECOPD Patient in China. *Front Cell Infect Microbiol*, 11:739211.
38. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol*, 16(2):91-102.
39. Dekic S, Hrenovic J, Ivankovic T, van Wilpe E. (2018). Survival of ESKAPE pathogen *Acinetobacter baumannii* in water of different temperatures and pH. *Water Sci Technol*, 78(6):1370-1376.

REFERENCIAS

40. Etebu E, Ariekpar I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res*, 4(2016):90-101.
41. Michigan State University, University of Minnesota. Antimicrobial Resistance Learning Site. Recuperado el 28 de julio de 2023. Disponible en: <https://amrls.umn.edu/microbiology>.
42. Aljeldah MM. (2022). Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat. *Antibiotics*, 11(8):1082.
43. Mora-Ochomogo M, Lohans CT. (2021). β -Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates. *RSC Med Chem*, 12(10):1623-1639.
44. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. (2016). A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clin Microbiol Rev*, 29(1):29-57.
45. Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. (2021). *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, 10(3):373.
46. Lee C, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha C, Jeong BC, Lee SH. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol*, 7:55.
47. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, Retailleau P, Iorga BI. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1):917-919.
48. Ramirez MS, Bonomo RA, Tolmasky ME. (2020). Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. *Biomolecules*, 10(5):720.

49. Huang L, Wu C, Gao H, Xu C, Dai M, Huang L, Hao H, Wang X, Cheng G. (2022). Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics*, 11(4):520.
50. Kornelsen V, Kumar A. (2021). Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Acinetobacter spp.* *Antimicrob Agents Chemother*, 65(7):e0051421.
51. Bolla JR, Howes AC, Fiorentino F, Robinson CV. (2020). Assembly and regulation of the chlorhexidine-specific efflux pump Acel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(29):17011-17018.
52. Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, Mobed A, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Kafil HS. (2020). *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infect Drug Resist*, 13:423-434.
53. Wu H, Xiao Z, Lv X, Huang H, Liao C, Hui C, Xu Y, Li H. (2023). Drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: From molecular mechanisms to potential therapeutics (Review). *Exp Ther Med*, 25(5):209.
54. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, (EUCAST). *Disk Diffusion Methodology for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Recuperado el 28 de julio de 2023. Disponible en: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology.
55. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, (EUCAST). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023*. Recuperado el 28 de julio de 2023. Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
56. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, (EUCAST). *MIC determination by broth microdilution method*. Recuperado el 28 de julio de 2023. Disponible en: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination.
57. Magiorakos A-, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. (2012). Multidrug-

REFERENCIAS

resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3):268-281.

58. Noel HR, Petrey JR, Palmer LD. (2022). Mobile genetic elements in *Acinetobacter* antibiotic-resistance acquisition and dissemination. *Ann N Y Acad Sci*, 1518(1):166-182.

59. Jeon JH, Jang K, Lee JH, Kang L, Lee SH. (2023). Transmission of antibiotic resistance genes through mobile genetic elements in *Acinetobacter baumannii* and gene-transfer prevention. *Sci Total Environ*, 857(Pt 2):159497.

60. Partridge Sally R, Kwong Stephen M, Neville F, Jensen Slade O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 31(4):e00088-17.

61. Warnke-Sommer J, Ali H. (2016). Graph mining for next generation sequencing: leveraging the assembly graph for biological insights. *BMC Genom*, 17(1):340.

62. Hassan R, Mukhtar A, Hasanin A, Ghaith D. (2018). Role of insertion sequence *Aba-1* and *AdeS* in reduced tigecycline susceptibility in MDR-*Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Cairo, Egypt. *J Chemother*, 30(2):89-94.

63. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol*, 3:148.

64. Pagano M, Martins AF, Barth AL. (2016). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian J Microbiol*, 47(4):785-792.

65. Brovedan MA, Cameranesi MM, Limansky AS, Morán-Barrio J, Marchiaro P, Repizo GD. (2020). What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus?. *World J Microbiol Biotechnol*, 36(8):109.

66. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. (2010). Characterization and PCR-Based Replicon Typing of Resistance Plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(10):4168-4177.
67. Lam Margaret MC, Jonathan K, Holt Kathryn E, Hall Ruth M, Mehrad H. (2022). Detection and Typing of Plasmids in *Acinetobacter baumannii* Using rep Genes Encoding Replication Initiation Proteins. *Microbiol Spectr*, 11(1):2478.
68. Lean SS, Yeo CC. (2017). Small, Enigmatic Plasmids of the Nosocomial Pathogen, *Acinetobacter baumannii*: Good, Bad, Who Knows?. *Front Microbiol*, 8:1547.
69. Rafei R, Kempf M, Eveillard M, Dabboussi F, Hamze M, Joly-Guillou M. (2014). Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol*, 9(10):1179-1194.
70. Rafei R, Osman M, Dabboussi F, Hamze M. (2019). Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiol*, 14:1065-1080.
71. Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*, 43(9):4382-4390.
72. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One*, 5(4):e10034.
73. Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. (2016). Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. *PLoS One*, 11(4):e0153014.

REFERENCIAS

74. Mohammad H, Nigro Steven J, Hall Ruth M. (2017). Problems with the Oxford Multilocus Sequence Typing Scheme for *Acinetobacter baumannii*: Do Sequence Type 92 (ST92) and ST109 Exist?. J Clin Microbiol, 55(7):2287-2289.
75. Gaiarsa S, Batisti Biffignandi G, Esposito EP, Castelli M, Jolley KA, Brisse S, Sasser D, Zarrilli R. (2019). Comparative Analysis of the Two *Acinetobacter baumannii* Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes. Front Microbiol, 10:930.
76. Higgins PG, Prior K, Harmsen D, Seifert H. (2017). Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. PLoS One, 12(6):e0179228.
77. Hansen F, Porsbo LJ, Frandsen TH, Kaygisiz ANS, Roer L, Henius AE, Holzknicht BJ, Søes L, Schønning K, Røder BL, Justesen US, Østergaard C, Dzajic E, Wang M, Ank N, Higgins PG, Hasman H, Hammerum AM. (2023). Characterisation of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from danish patients 2014–2021: detection of a new international clone – IC11. Int J Antimicrob Agents, 62(2):106866.
78. Agyepong N, Fordjour F, Owusu-Ofori A. (2023). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings in Africa. Front Trop Dis, 4: 1110125.
79. Shelenkov A, Akimkin V, Mikhaylova Y. (2023). International Clones of High Risk of *Acinetobacter baumannii*-Definitions, History, Properties and Perspectives. Microorganisms, 11(8):2115.
80. Hassan RM, Salem ST, Hassan SIM, Hegab AS, Elkholy YS. (2021). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Egyptian patients. PLoS One, 16(6):e0251508.
81. Al-Hassan L, Zafer MM, El-Mahallawy H. (2019). Multiple sequence types responsible for healthcare-associated *Acinetobacter baumannii* dissemination in a single centre in Egypt. BMC Infect Dis, 19(1):829.

82. Hamed SM, Elkhatib WF, Brangsch H, Gesraha AS, Moustafa S, Khater DF, Pletz MW, Sprague LD, Neubauer H, Wareth G. (2023). *Acinetobacter baumannii* Global Clone-Specific Resistomes Explored in Clinical Isolates Recovered from Egypt. *Antibiotics*, 12(7):1149.
83. Al-Hassan LL, Al-Madboly LA. (2020). Molecular characterisation of an *Acinetobacter baumannii* outbreak. *Infect Prev Pract*, 2(2):100040.
84. Al-Hassan L, Elbadawi H, Osman E, Ali S, Elhag K, Cantillon D, Wille J, Seifert H, Higgins PG. (2021). Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* From Khartoum State, Sudan. *Front Microbiol*, 12:628736.
85. Hamed SM, Hussein AFA, Al-Agamy M, Radwan HH, Zafer MM. (2022). Genetic Configuration of Genomic Resistance Islands in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates From Egypt. *Front Microbiol*, 13:878912.
86. Nawfal Dagher T, Al-Bayssari C, Chabou S, Antar N, Diene SM, Azar E, Rolain J. (2019). Investigation of multidrug-resistant ST2 *Acinetobacter baumannii* isolated from Saint George hospital in Lebanon. *BMC Microbiol*, 19(1):29-2.
87. Higgins PG, Hagen RM, Kreikemeyer B, Warnke P, Podbielski A, Frickmann H, Loderstädt U. (2021). Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from Northern Africa and the Middle East. *Antibiotics*, 10(3):291.
88. Shah MW, Yasir M, Farman M, Jiman-Fatani AA, Almasaudi SB, Alawi M, El-Hossary D, Azhar EI. (2019). Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii* in Western Saudi Arabia. *Microb Drug Resist*, 25(9):1297-1305.
89. Ejaz H, Ahmad M, Younas S, Junaid K, Abosalif KOA, Abdalla AE, Alameen AAM, Elamir MYM, Bukhari SNA, Ahmad N, Qamar MU. (2021). Molecular Epidemiology of Extensively-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence

REFERENCIAS

Type 2 Co-Harboring *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA} From Clinical Origin. *Infect Drug Resist*, 14:1931-1939.

90. European Centre for Disease Prevention and Control, (ECDC). Surveillance Atlas of Infectious Diseases, Antimicrobial Resistance. Recuperado el 4 de agosto de 2023. Disponible en: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>.

91. Bonnin RA, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. (2013). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone, France. *Emerg Infect Dis*, 19(5):822-823.

92. Xanthopoulou K, Urrutikoetxea-Gutiérrez M, Vidal-Garcia M, Diaz de Tuesta del Arco, José-Luis, Sánchez-Urtaza S, Wille J, Seifert H, Higgins PG, Gallego L. (2020). First Report of New Delhi Metallo- β -Lactamase-6 (NDM-6) in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate From Northern Spain. *Front Microbiol*, 11: 589253.

93. Hernández M, Iglesias MR, Rodríguez-Lázaro D, Gallardo A, Quijada N, Miguela-Villoldo P, Campos MJ, Píriz S, López-Orozco G, de Frutos C, Sáez JL, Ugarte-Ruiz M, Domínguez L, Quesada A. (2017). Co-occurrence of colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* among multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from cattle, Spain, September 2015. *Euro Surveill*, 22(31):30586.

94. Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM, Hernández M. (2019). TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics*, 35(21):4207-4212.

95. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114-2120.

96. Schmieder R, Edwards R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6):863-864.

97. Wood DE, Salzberg SL. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol*, 15(3):R46.

98. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19(5):455-477.
99. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8):1072-1075.
100. Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14):2068-2069.
101. Wood DE, Lu J, Langmead B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*, 20(1):257.
102. Qiong W, Garrity George M, Tiedje James M, Cole James R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, 73(16):5261-5267.
103. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect*, 9(8):ix-xv.
104. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SGB, Livermore DM. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents*, 27(4):351-353.
105. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. (2010). Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *Int J Antimicrob Agents*, 35(3):305.
106. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. (2013). OXA-235, a Novel Class D β -Lactamase Involved in Resistance to

REFERENCIAS

Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(5):2121-2126.

107. Cerezales M, Biniössek L, Gerson S, Xanthopoulou K, Wille J, Wohlfarth E, Kaase M, Seifert H, Higgins, Paul G. (2021). Novel multiplex PCRs for detection of the most prevalent carbapenemase genes in Gram-negative bacteria within Germany. *J Med Microbiol*, 70(3):001310.

108. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform*, 10(1):421.

109. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, 67(11):2640-2644.

110. Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, Edalatmand A, Petkau A, Syed SA, Tsang KK, Baker SJC, Dave M, McCarthy MC, Mukiri KM, Nasir JA, Golbon B, Imtiaz H, Jiang X, Kaur K, Kwong M, Liang ZC, Niu KC, Shan P, Yang JYJ, Gray KL, Hoad GR, Jia B, Bhandu T, Carfrae LA, Farha MA, French S, Gordzevich R, Rachwalski K, Tu MM, Bordeleau E, Dooley D, Griffiths E, Zubyk HL, Brown ED, Maguire F, Beiko RG, Hsiao WWL, Brinkman FSL, Van Domselaar G, McArthur AG. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res*, 51(D1):D690-D699.

111. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain J. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(1):212-220.

112. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res*, 47(D1):D687-D692.

113. O'Toole GA, Kolter R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 28(3):449-461.
114. Ueno Y, Arita M, Kumagai T, Asai K. (2003). Processing sequence annotation data using the Lua programming language. *Genome Inform*, 14:154-163.
115. Li H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18):3094-3100.
116. De Coster W, Rademakers R. (2023). NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 39(5):btad311.
117. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol*, 37(5):540-546.
118. Wick RR, Schultz MB, Zobel J, Holt KE. (2015). Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*, 31(20):3350-3352.
119. Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A2. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microb Genom*, 7(11):000685.
120. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S, Hsu C, McDermott PF, Tadesse DA, Morales C, Simmons M, Tillman G, Wasilenko J, Folster JP, Klimke W. (2019). Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(11):e00483-19.
121. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FSL, Wright GD, McArthur AG. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric

REFERENCIAS

curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*, 45(D1):D566-D573.

122. Robertson J, Nash, John H. E. YR 2018. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom*, 4(8):e000206.

123. Redondo-Salvo S, Bartomeus-Peñalver R, Vielva L, Tagg KA, Webb HE, Fernández-López R, de la Cruz F. (2021). COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. *BMC Bioinform*, 22(1):390.

124. Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen C, Graham M, Van Domselaar G, Stothard P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 51(W1):W484-W492.

125. Cosgaya C, Ratia C, Marí-Almirall M, Rubio L, Higgins PG, Seifert H, Roca I, Vila J. (2019). In vitro and in vivo Virulence Potential of the Emergent Species of the *Acinetobacter baumannii* (Ab) Group. *Front Microbiol*, 10:2429.

126. Elwakil WH, Rizk SS, El-Halawany A, Rateb ME, Attia AS. (2023). Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections in the United Kingdom versus Egypt: Trends and Potential Natural Products Solutions. *Antibiotics*, 12(1):77.

127. El-Kholy A, El-Mahallawy HA, Elsharnouby N, Abdel Aziz M, Helmy AM, Kotb R. (2021). Landscape of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections in Egypt: Survey and Literature Review. *Infect Drug Resist*, 14:1905-1920.

128. Almaghrabi MK, Joseph MRP, Assiry MM, Hamid ME. (2018). Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Health Threat in Aseer Region, Kingdom of Saudi Arabia. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2018:9182747.

129. Asaad AM, Ansari S, Ajlan SE, Awad SM. (2021). Epidemiology of Biofilm Producing *Acinetobacter baumannii* Nosocomial Isolates from a Tertiary Care Hospital in Egypt: A Cross-Sectional Study. *Infect Drug Resist*, 14:709-717.

130. Zorgani A. (2017). An Increasing Threat in Libyan Hospitals: Emergence of Extensively-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ec Microbiology*, 6(2):47-50.
131. Shali AAK, Jalal PJ, Arif SK. (2022). Dissemination and Genetic Relatedness of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Burn Hospital in Iraq. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2022:8243192.
132. Ghiwa M, Ibrahim B, Tamara S, Balig P, Sahar A, Harout A, Matej M, Jaroslav H, Merheb-Ghoussoub Samar, Sima T. (2020). Whole-Genome-Sequence-Based Characterization of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Hospital Outbreak. *mSphere*, 5:e00934-19.
133. Mahmoudi Monfared A, Rezaei A, Poursina F, Faghri J. (2019). Detection of Genes Involved in Biofilm Formation in MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* Isolated from Human Clinical Specimens in Isfahan, Iran. *Arch Clin Infect Dis*, 14(2):e85766.
134. Ibrahim MA, Abdallah S, Soliman IS, Afifi N, Atiat Allah M, Nazmy Agban. (2023). Hospital-Acquired Infection by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter* Species in ICUs in Assiut, Egypt. *Egypt J Med Microbiol*, 32(1):97-104.
135. Said HS, Benmahmod AB, Ibrahim RH. (2018). Co-production of AmpC and extended spectrum beta-lactamases in cephalosporin-resistant *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *World J Microbiol Biotechnol*, 34(12):189.
136. ELsheredy A, Yousif Z, Elghazzawi E, Elmenshawy A, Ghazal A. (2021). Prevalence of Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes and *armA* among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates in Alexandria, Egypt. *Infect Disord Drug Targets*, 21(8):e300821191828.
137. Kishk R, Soliman N, Nemr N, Eldesouki R, Mahrous N, Gobouri A, Azab E, Anani M. (2021). Prevalence of Aminoglycoside Resistance and Aminoglycoside Modifying Enzymes in *Acinetobacter baumannii* Among Intensive Care Unit Patients, Ismailia, Egypt. *Infect Drug Resist*, 14:143-150.

REFERENCIAS

138. Makharita RR, El-Kholy I, Hetta HF, Abdelaziz MH, Hagagy FI, Ahmed AA, Algammal AM. (2020). Antibiogram and Genetic Characterization of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Pathogens Incriminated in Healthcare-Associated Infections. *Infect Drug Resist*, 13:3991-4002.
139. Fam NS, Gamal D, Mohamed SH, Wasfy RM, Soliman MS, El-Kholy AA, Higgins PG. (2020). Molecular Characterization of Carbapenem/Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Egypt by Whole-Genome Sequencing. *Infect Drug Resist*, 13:4487-4493.
140. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*, 3:124.
141. Jalal D, Elzayat MG, Diab AA, El-Shqanqery HE, Samir O, Bakry U, Hassan R, Elanany M, Shalaby L, Sayed AA. (2021). Deciphering Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* from a Pediatric Cancer Hospital in Egypt. *mSphere*, 6(6):e0072521.
142. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M, Brisse S, Zarrilli R. (2011). Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect*, 17(2):197-201.
143. Vali L, Dashti K, Opazo-Capurro AF, Dashti AA, Al Obaid K, Evans BA. (2015). Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait. *Front Microbiol*, 6:743.
144. Lopes BS, Al-Agamy MH, Ismail MA, Shibl AM, Al-Qahtani AA, Al-Ahdal MN, Forbes KJ. (2015). The transferability of *bla*OXA-23 gene in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Saudi Arabia and Egypt. *Int J Med Microbiol*, 305(6):581-588.
145. Wibberg D, Salto IP, Eikmeyer FG, Maus I, Winkler A, Nordmann P, Pühler A, Poirel L, Schlüter A. (2018). Complete Genome Sequencing of *Acinetobacter*

baumannii Strain K50 Discloses the Large Conjugative Plasmid pK50a Encoding Carbapenemase OXA-23 and Extended-Spectrum β -Lactamase GES-11. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(5):e00212-18.

146. Ghaith DM, Zafer MM, Al-Agamy MH, Alyamani EJ, Booq RY, Almoazzamy O. (2017). The emergence of a novel sequence type of MDR *Acinetobacter baumannii* from the intensive care unit of an Egyptian tertiary care hospital. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 16(1):34.

147. Zowawi HM, Sartor AL, Sidjabat HE, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, AlJindan RY, Alfaresi M, Ibrahim E, Al-Jardani A, Al Salman J, Dashti AA, Johani K, Paterson DL. (2015). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in the Gulf Cooperation Council States: dominance of OXA-23-type producers. *J Clin Microbiol*, 53(3):896-903.

148. Kurihara MNL, de Sales RO, da Silva KE, Maciel WG, Simionatto S. (2020). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. *Rev Soc Bras Med Trop*, 53: e20200248.

149. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Mallat H, Rolain J, Joly-Guillou M, Kempf M. (2014). First report of *bla*NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *Int J Infect Dis*, 21:21-23.

150. Jaidane N, Naas T, Oueslati S, Bernabeu S, Boujaafar N, Bouallegue O, Bonnin RA. (2018). Whole-genome sequencing of NDM-1-producing ST85 *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents*, 52(6):916-921.

151. Al-Hamad A, Pal T, Leskafi H, Abbas H, Hejles H, Alsubikhy F, Darwish D, Ghazawi A, Sonnevend A. (2020). Molecular characterization of clinical and environmental carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a hospital of the Eastern Region of Saudi Arabia. *J Infect Public Health*, 13(4):632-636.

REFERENCIAS

152. Fernández-Cuenca F, Pérez-Palacios P, Galán-Sánchez F, López-Cerero L, López-Hernández I, López Rojas R, Arca-Suárez J, Díaz-de Alba P, Rodríguez Iglesias M, Pascual A. (2020). First identification of *bla*NDM-1 carbapenemase in *bla*OXA-94-producing *Acinetobacter baumannii* ST85 in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 38(1):11-15.
153. Wareth G, Linde J, Hammer P, Splettstoesser WD, Pletz MW, Neubauer H, Sprague LD. (2021). Molecular Characterization of German *Acinetobacter baumannii* Isolates and Multilocus Sequence Typing (MLST) Analysis Based on WGS Reveals Novel STs. *Pathogens*, 10(6):690.
154. Zafer MM, Hussein AFA, Al-Agamy MH, Radwan HH, Hamed SM. (2021). Genomic Characterization of Extensively Drug-Resistant NDM-Producing *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates With the Emergence of Novel *bla*ADC-257. *Front. Microbiol*, 12:736982.
155. Kumar S, Anwer R, Azzi A. (2021). Virulence Potential and Treatment Options of Multidrug-Resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 9(10):2104.
156. Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samadi E, Haghi F. (2019). Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis*, 19(1):629-0.
157. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, Bisetegn H, Sahle Z. (2021). *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. *Infect Drug Resist*, 14:3711-3719.
158. Ghasemi E, Ghalavand Z, Goudarzi H, Yeganeh F, Hashemi A, Dabiri H, Mirsamadi ES, Foroumand M. (2018). Phenotypic and Genotypic Investigation of Biofilm Formation in Clinical and Environmental Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Arch Clin Infect Dis*, 13(4):e12914.

159. Fallah A, Rezaee MA, Hasani A, Barhaghi MHS, Kafil HS. (2017). Frequency of *bap* and *cpaA* virulence genes in drug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their role in biofilm formation. Iran J Basic Med Sci, 20(8):849-855.
160. Shakib P, Halimi S, Rezaei F, Delfani S. (2022). Expression of *bap* Gene in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates in Khorramabad, Iran. Gene, Cell and Tissue, 10(2):e124061.
161. Saadulla SOK, Muhammed SM. (2023). Detection of biofilm-related genes and antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens. Biodiversitas, 24(3):1809-1816.
162. Kishii K, Hamada M, Aoki K, Ito K, Onodera J, Ishii Y, Tateda K. (2020). Differences in biofilm formation and transcription of biofilm-associated genes among *Acinetobacter baumannii* clinical strains belonging to the international clone II lineage. J Infect Chemother, 26(7):693-698.
163. Krasauskas R, Skerniškytė J, Armalytė J, Sužiedėlienė E. (2019). The role of *Acinetobacter baumannii* response regulator BfmR in pellicle formation and competitiveness via contact-dependent inhibition system. BMC Microbiol, 19(1):241.
164. Draughn GL, Milton ME, Feldmann EA, Bobay BG, Roth BM, Olson AL, Thompson RJ, Actis LA, Davies C, Cavanagh J. (2018). The Structure of the Biofilm-controlling Response Regulator BfmR from *Acinetobacter baumannii* Reveals Details of Its DNA-binding Mechanism. J Mol Biol, 430(6):806-821.
165. He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J, Cheng H, Cao J, Lu G. (2015). Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. Antimicrob Agents Chemother, 59(8):4817-4825.
166. Weidensdorfer M, Ishikawa M, Hori K, Linke D, Djahanschiri B, Iruegas R, Ebersberger I, Riedel-Christ S, Enders G, Leukert L, Kraiczky P, Rothweiler F,

REFERENCIAS

- Cinatl J, Berger J, Hipp K, Kempf VAJ, Göttig S. (2019). The *Acinetobacter* trimeric autotransporter adhesin Ata controls key virulence traits of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 10(1):68-81.
167. Law SKK, Tan HS. (2022). The role of quorum sensing, biofilm formation, and iron acquisition as key virulence mechanisms in *Acinetobacter baumannii* and the corresponding anti-virulence strategies. *Microbiol Res*, 260:127032.
168. Khoshnood S, Sadeghifard N, Mahdian N, Heidary M, Mahdian S, Mohammadi M, Maleki A, Haddadi MH. (2023). Antimicrobial resistance and biofilm formation capacity among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients with burns and ventilator-associated pneumonia. *J Clin Lab Anal*, 37(1):e24814.
169. Skariyachan S, Taskeen N, Ganta M, Venkata Krishna B. (2019). Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Crit Rev Microbiol*, 45(3):315-333.
170. Al-Shamiri MM, Zhang S, Mi P, Liu Y, Xun M, Yang E, Ai L, Han L, Chen Y. (2021). Phenotypic and genotypic characteristics of *Acinetobacter baumannii* enrolled in the relationship among antibiotic resistance, biofilm formation and motility. *Microb Pathog*, 155:104922.
171. Blaschke U, Skiebe E, Wilharm G. (2021). Novel Genes Required for Surface-Associated Motility in *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol*, 78(4):1509-1528.
172. Li P, Zhang S, Wang J, Al-Shamiri MM, Han B, Chen Y, Han S, Han L. (2023). Uncovering the Secretion Systems of *Acinetobacter baumannii*: Structures and Functions in Pathogenicity and Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, 12(2):195.
173. Dong J, Liu C, Wang P, Li L, Zou Q. (2022). The type VI secretion system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and its roles in antimicrobial resistance acquisition. *Microb Pathog*, 169:105668.

174. Cavallo I, Oliva A, Pages R, Sivori F, Truglio M, Fabrizio G, Pasqua M, Pimpinelli F, Di Domenico EG. (2023). *Acinetobacter baumannii* in the critically ill: complex infections get complicated. *Front Microbiol*, 14:1196774.
175. Muthuirulandi Sethuvel DP, Devanga Ragupathi NK, Bakthavatchalam YD, Vijayakumar S, Varghese R, Shankar C, Jacob JJ, Vasudevan K, Elangovan D, Balaji V. (2019). Current strategy for local- to global-level molecular epidemiological characterisation of global antimicrobial resistance surveillance system pathogens. *Indian J Med Microbiol*, 37(2):147-162.
176. Vijayakumar S, Jacob JJ, Vasudevan K, Mathur P, Ray P, Neeravi A, Baskaran A, Kirubananthan A, Anandan S, Biswas I, Walia K, Veeraraghavan B. (2022). Genomic Characterization of Mobile Genetic Elements Associated With Carbapenem Resistance of *Acinetobacter baumannii* From India. *Front Microbiol*, 13:869653.
177. Abouelfetouh A, Torky AS, Aboulmagd E. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control*, 8(1):185.
178. Hua X, Shu J, Ruan Z, Yu Y, Feng Y. (2016). Multiplication of *bla*OXA-23 is common in clinical *Acinetobacter baumannii*, but does not enhance carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother*, 71(12):3381-3385.
179. Hamidian M, Nigro SJ. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom*, 5(10):e000306.
180. Wang Y, Wu C, Zhang Q, Qi J, Liu H, Wang Y, He T, Ma L, Lai J, Shen Z, Liu Y, Shen J. (2012). Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of Food Animal Origin. *PLoS One*, 7(5):e37152.
181. Bonnin Rémy A, Rotimi Vincent O, Al HM, Elise G, Al SN, Patrice N, Laurent P. (2013). Wide Dissemination of GES-Type Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Kuwait. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(1):183-188.

REFERENCIAS

182. Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, Sandalli C. (2014). OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect*, 20(5):410-415.
183. Chihi H, Bonnin RA, Bourouis A, Mahrouki S, Besbes S, Moussa MB, Belhadj O, Naas T. (2016). GES-11-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Tunisian hospitals: Long-term dissemination of GES-type carbapenemases in North Africa. *J Glob Antimicrob Resist*, 5:47-50.
184. Ramadan RA, Gebriel MG, Kadry HM, Mosallem A. (2018). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of carbapenemase genes and E-test evaluation of colistin-based combinations. *Infect Drug Resist*, 11:1261-1269.
185. Karah N, Khalid F, Wai SN, Uhlin BE, Ahmad I. (2020). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance features of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Pakistan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 19(1):2.
186. Al-Agamy M, Khalaf NG, Tawfick MM, Shibl AM, Kholly AE. (2014). Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt. *Int J Infect Dis*, 22:49-54.
187. Cheng C, Sun J, Zheng F, Lu W, Yang Q, Rui Y. (2016). New structures simultaneously harboring class 1 integron and ISCR1-linked resistance genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol*, 16(1):71.
188. Naeimi Mazraeh F, Hasani A, Sadeghi J, Samadi Kafil H, Soroush Barhaghi MH, Yeganeh Sefidan F, Rishi Sharabiani H, Hematyar Y, Ahangarzadeh Rezaee M. (2021). High frequency of *bla*PER-1 gene in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* and its association with quorum sensing and virulence factors. *Gene Rep*, 24:101232.

189. Poirel L, Sadek M, Nordmann P. (2021). Contribution of PER-Type and NDM-Type β -Lactamases to Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 65(10):e0087721.
190. Matos AP, Cayô R, Almeida LGP, Streling AP, Nodari CS, Martins, Willames M B S, Narciso AC, Silva RM, Vasconcelos ATR, Gales AC. (2019). Genetic Characterization of Plasmid-Borne *bla*(OXA-58) in Distinct *Acinetobacter* Species. *mSphere*, 4(5):e00376-19.
191. Helmy OM, Kashef MT. (2017). Different phenotypic and molecular mechanisms associated with multidrug resistance in Gram-negative clinical isolates from Egypt. *Infect Drug Resist*, 10:479-498.
192. Ghaly TM, Paulsen IT, Sajjad A, Tetu SG, Gillings MR. (2020). A Novel Family of *Acinetobacter* Mega-Plasmids Are Disseminating Multi-Drug Resistance Across the Globe While Acquiring Location-Specific Accessory Genes. *Front Microbiol*, 11:605952.
193. Blackwell GA, Hall RM. (2019). Mobilisation of a small *Acinetobacter* plasmid carrying an oriT transfer origin by conjugative RepAci6 plasmids. *Plasmid*, 103:36-44.
194. Opazo A, Sonnevend A, Lopes B, Hamouda A, Ghazawi A, Pal T, Amyes SGB. (2012). Plasmid-encoded PER-7 β -lactamase responsible for ceftazidime resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated in the United Arab Emirates. *J Antimicrob Chemother*, 67(7):1619-1622.
195. Khezri A, Avershina E, Ahmad R. (2021). Hybrid Assembly Provides Improved Resolution of Plasmids, Antimicrobial Resistance Genes, and Virulence Factors in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Microorganisms*, 9(12):2560.



eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea