



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS DEL COMPLEJO *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* POR SU PERFIL PLASMÍDICO, PULSOTIPOS, SECUENCIAS TIPO Y SISTEMA CRISPR-CAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. MANCILLA ROJANO JETSI VIRIDIANA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ARIADNNA DEL CARMEN CRUZ CÓRDOVA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM
DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., JUNIO DE 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

OFICIO CPCB/565/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

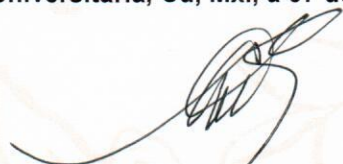
M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de enero de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MANCILLA ROJANO JETSI VIRIDIANA** con número de cuenta **307202589**, con la tesis titulada “**TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS DEL COMPLEJO *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* POR SU PERFIL PLASMÍDICO, PULSOTIPO, SECUENCIAS TIPO Y SISTEMA CRISPR-Cas**”, realizada bajo la dirección de la **DRA. ARIADNNA DEL CARMEN CRUZ CÓRDOVA**:

Presidente: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO
Vocal: DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE
Secretario: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ
Suplente: DR. OSCAR MEDINA CONTRERAS
Suplente: DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 07 de mayo de 2019



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mis estudios de maestría en dicha institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con número 605309, durante el período Agosto 2016- Julio 2018.

Este proyecto fue financiado por Fondos Federales HIM/2017/003 SSA 1299, forma parte del protocolo: **Epidemiología molecular y determinantes génicos en aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*.**

Agradezco a mi tutora, la Dra. Ariadna del Carmen Cruz Córdova, por la asesoría que me otorgó para la realización del presente proyecto; así mismo, externo mi agradecimiento y respeto al Comité Tutor conformado por el Dr. Juan Xicohtencatl Cortes y la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, a cada uno de sus integrantes por el apoyo brindado durante la elaboración de mi proyecto.

Al Laboratorio Central de Bacteriología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, al Q.C Israel Parra Ortega, a la Q.C. Isabel Franco Hernández y a la Q.C. María del Carmen Castellanos Cruz, por el apoyo brindado para el aislamiento de las muestras.

Al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, por la asesoría brindada para la estandarización de la técnica de perfil de plásmidos y MLST.

Al Departamento de Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición “Salvador Zubirán”, a la Dra. Miriam Bobadilla del Valle y al Q.C. Francisco Leal Vega, por el apoyo y los comentarios brindados para la estandarización de la técnica de perfil de plásmidos.

DEDICATORIA

Agradezco a la Máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi hogar durante 13 años, mismos en los que me he formado como estudiante y persona. Teniendo en cuenta la enorme responsabilidad que conlleva el seguir desarrollándome profesionalmente, es un honor, un privilegio y un gran orgullo formar parte de la UNAM.

**La función de la educación es enseñar a pensar intensa y críticamente.
Formar inteligencia y carácter... esa es la meta de la verdadera educación.
Martin Luther King, Jr**

A quién desde que la conocí me transmitió la pasión por la ciencia, sin saber que más tarde me convertiría en su alumna, a la *Dra. Ari*. Ha sido un camino largo y a veces complicado de emprender, pero si alguien me ha sostenido no sólo académicamente, sino también a nivel personal, ha sido usted. Gracias por el tiempo, por los conocimientos, por las palabras en los momentos difíciles, por abrazarme cuando la presión y los miedos me han invadido, pero sobre todo gracias por enseñarme la buena cara de la ciencia, por enseñarme que la honestidad, responsabilidad, el amor y lealtad por nuestros ideales, son la base de todo buen científico.

Al *Dr. Juan Xicohtencatl*, quien desde que lo conocí me ha brindado su apoyo incondicional, gracias porque desde el primer día en el laboratorio me ha dado grandes lecciones de vida, gracias por sus buenos consejos, pero principalmente por la confianza que ha depositado en mí, por las charlas y las palabras de aliento que siempre ha tenido a bien brindarme.

A quién me dio las bases para emprender este viaje, a la *Dra. Irma Rosas*, gracias por seguir guiándome y apoyándome en esta etapa. A *Lety* y *Eva*, porque me formaron y guiaron, siempre han sido parte fundamental en este andar, gracias por escucharme y darme buenos consejos y aprendizajes, pero sobre todo por brindarme su amistad y cariño de manera incondicional. A *Iván* porque a pesar de los años me sigue llenando de aprendizajes, gracias por tus consejos y por escucharme siempre que lo necesito.

**Lo que hace indisoluble a las amistades y dobla su encanto, es un sentimiento que le falta al amor, la certeza.
Honoré de Balzac.**

En estos años tuve la fortuna de crear lazos de amistad con muchas personas; sin embargo, he sido aún más afortunada al saber que el tiempo y los momentos difíciles me han dejado a lado de los verdaderos amigos: mi familia de vida. A *Dianita*, que a pesar de los diferentes husos horarios y de que nos separen miles de kilómetros me ha escuchado y me ha sostenido en los momentos más difíciles, siempre tienes las palabras correctas para hacerme sentir mejor, gracias por las largas charlas que me has regalado, por las risas, pero sobre todo por el cariño que siempre me das. A *Omar* quién siempre tiene una flor para alegrarme la vida y una sonrisa que aligera los días malos, gracias amigo por abrazarme cuando he tenido el alma rota, tus abrazos siempre curan mis tristezas, gracias por quererme tanto. A *Solerito* que siempre me escucha y está a pesar de los años y de que nuestras vidas han tomado rumbos diferentes, siempre hay tiempo para compartir las penas y disfrutar de la alegría de la vida. A *Hayde* y *Mely*, porque a pesar de que las responsabilidades parecieran no regalarnos mucho tiempo, no hay excusas ni distancias para seguir compartiendo alegrías, gracias por siempre escucharme, regañarme y estar a pesar de todo, las amo mucho!!!!.

**No puede haber amistad donde no hay libertad. La amistad ama la libertad,
y no será encerrada en pequeños y estrechos recintos.
William Penn**

Un lugar nuevo siempre genera miedo, dudas y nuevas ilusiones...estar en el LIBI no sólo me ha llenado de nuevos aprendizajes y experiencias, también de excelentes amigos... A *Verito*, porque desde que la conocí me brindó su confianza y cariño, gracias porque si de alguien recibí apoyo en los primeros meses fue de tu parte, sé que esta amistad que hemos formado va más allá de las distancias, el tiempo y formas de pensar. A *Kary* por alegrarme los días con su hermosa voz y presencia, gracias porque siempre me has apoyado, por tus abrazos que me han dado aliento en los malos momentos y en los buenos lo han quitado, gracias por tu cariño. A *Gerardo Escalona*, porque siempre me ha apoyado no sólo académicamente sino también a nivel personal, gracias por ser mi amigo, por escucharme y darme buenos consejos (perdón por nunca hacerte caso). A *Vicenta*, por contagiarme su amor a la ciencia, a don *Ale* porque siempre me contagia su alegría y disposición a apoyar., a don *Richie*, porque siempre me hizo reír. A la *Dra. Sarita* por los

conocimientos y consejos que me ha brindado. A quienes con sus risas alegran el laboratorio...a *Sandy, Mextli, Itzel, Dany y Laura*. A Marco, porque siempre comparte sus conocimientos y pasión por la ciencia. A *Ricardo Ahumada*, porque siempre me escucha y llena de consejos, gracias por apoyarme en esta etapa tan difícil de austeridad. Al Dr. *Víctor* porque siempre me hace reír con sus ocurrencias, gracias por transmitirme tu loca pasión por la ciencia, gracias también por tus consejos (que tampoco hago caso). A *Rubí* que siempre escucha mis dramas y me abraza cuando más lo necesité, gracias por soportarme y enseñarme a mirar lo mejor en mí, ¡te quiero mucho!. A *Ricardo*, porque soporta mis locuras, gracias por todo lo que hemos compartido en este tiempo, por los buenos y malos momentos que me han hecho crecer a nivel personal, gracias por escucharme y siempre estar, sin duda has hecho que esta etapa sea mucho mejor.

La familia es la brújula que nos guía. Es la inspiración para llegar a grandes alturas, y nuestro consuelo cuando ocasionalmente fallamos.
Brad Henry.

Nunca he tenido miedo de fallar, porque al final del día al llegar a casa todo se olvida... Ustedes han sido mi inspiración para querer ser mejor persona, todo lo bueno que soy ha sido gracias a cada uno de ustedes. Gracias a mis padres, porque han trabajado duro para brindarme la mejor de sus herencias: educación., Papá gracias por tu amor, por cuidarme, por respetar mis decisiones, gracias por el enorme esfuerzo que haces día a día por tu familia, gracias por siempre sostenerme. Mamá gracias por tu amor, por apoyarme, por cuidarme, por aguantar mis enojos y berrinches, gracias por ser mí fuerza. A mi tía Gaby, porque a pesar de ser tan diferentes siempre me cuidas y das consejos, gracias por ser mi confidente. A mis tíos Ricardo y Julia porque también han sido como unos padres, me han llenado de amor y buenos consejos, porque siempre tienen las palabras adecuadas, y calman mis dramas y miedos. A mi abuelita Julia, porque me llena de amor y cuidados, gracias por ser mi mamá, por apoyarme, por alegrarme los días, eres sin duda mi guía y bendición. A mis hermanos, que son mi alegría e inspiración para continuar...a Galy que me endulza mis días, a Fer que siempre me hace enojar, pero quererla más, a Diego que me hace reír siempre con sus ocurrencias...a los tres porque son mis compañeros de vida y sé que caminarla con ustedes es lo más increíble de este mundo. A Francisco, porque me ha brindado su amistad, cariño y apoyo, pero sobre todo gracias por querer y cuidar tanto a mi hermana.

Al ser que me brindó a estos seres... a mi abuelito Antonio, porque me enseñó que lo más hermoso de la vida es la familia. Siempre camino de tu mano, guiada por tu cariño y valores. Gracias por enseñarme que nada en esta vida tiene valor y no se disfruta de la misma manera si no lo haces de la mano de tu familia de sangre y de vida.

Nada en este mundo debe ser temido...solo entendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos.

Marie Curie

ÍNDICE

ÍNDICE	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.INTRODUCCIÓN	3
1.1 Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS)	3
1.2 <i>Acinetobacter spp</i>	4
1.2.1 Mecanismos de resistencia en <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
1.3. Técnicas de tipificación	11
1.3.1 MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)	12
1.3.2 Perfiles de DNA plasmídico	13
1.3.3 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE,Pulsed Field Gel Electrophoresis)	14
1.3.4 MLST (Multilocus Sequence Typing)	16
1.3.5 Sistema CRISPR-Cas	16
2. ANTECEDENTES	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	25
6.1 Objetivo General	25
6.2 Objetivos específicos	25
7. METODOLOGÍA	26
7.1 Material biológico	26
7.2 Identificación de aislados del complejo <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> a través de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time -of -Flight Mass Spectrometry)	26
7.3 Tipificación molecular.....	27
7.3.1 Extracción de ADN.....	27
7.3.2 Detección de genes blaOXA	27
7.3.3 Perfiles de DNA plasmídico mediante la técnica de Eckhardt (1978)	28
7.3.4 Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis)	29
7.3.5 Identificación de secuencias tipo a través de MLST (Multilocus Sequence Typing).....	30
7.3.6 Análisis bioinformático.....	32

7.3.6 Identificación del sistema CRISPR-CAS	33
8. RESULTADOS	34
8.1 Características de los aislados del complejo Acb	34
8.2. Identificación de aislados del complejo Acb con el equipo MALDI-TOF MS-Biotyper (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) y susceptibilidad a antibióticos.....	35
8.3. Detección de genes <i>bla_{OXA}</i>	38
8.4 Perfiles de DNA plasmídico mediante la técnica de Eckhardt (1978)	43
8.5 Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	47
8.6. MLST (Multilocus Sequence Typing).....	51
8.7. Sistema CRISPR-Cas	56
9. DISCUSIÓN.....	65
10. CONCLUSIONES	75
11. PERSPECTIVAS	76
12.LITERATURA CITADA.....	77
13. ANEXOS	86
13.1. Preparación de soluciones para el uso de MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time -of -Flight Mass Spectrometry).....	86
13.2. Espectros para la identificación de aislados del complejo Acb con el equipo MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time -of -Flight Mass Spectrometry)	87
13.3.Perfil de resistencia.....	90
14. APÉNDICE.....	92
14.1. Artículo publicado: Whole-Genome Sequences of Five <i>Acinetobacter baumannii</i> Strains From a Child With Leukemia M2	92

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Agentes etiológicos implicados en IAAS (Infecciones Asociadas a la Atención en Salud).	4
2	Principales agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) en unidades RHOVE (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica), México 2014.	7
3	Carbapenemasas de la familia OXA (betalactamasas).	10
4	Secuencias de iniciadores de los genes <i>bla_{OXA}</i> .	28
5	Secuencias de iniciadores utilizados para obtener la secuencia tipo de acuerdo al esquema Pasteur.	30
6	Secuencias de iniciadores utilizados para obtener la secuencia tipo de acuerdo al esquema Oxford.	31
7	Iniciadores para amplificación de las de espaciadores y secuencias repetidas en el sistema CRISPR-Cas .	33
8	Identificación fenotípica de las cepas clínicas a través de MALDI-TOF-MS-Biotyper y perfil de resistencia.	37
9	Asociación de los genes <i>bla_{OXA}</i> y perfil de resistencia.	39
10	Número de plásmidos identificados en las cepas del complejo <i>Acb</i> .	44
11	Pulsotipos obtenidos con la técnica de PFGE en las cepas del complejo <i>Acb</i> .	50
12	Secuencias Tipo obtenidas a través del protocolo Pasteur.	52
13	Secuencias Tipo obtenidas a través del protocolo Oxford.	55
14	Identificación del sistema CRISPR-Cas en cepas del complejo <i>Acb</i> .	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Proporción de microorganismos aislados en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), Unidades RHOVE (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica). México 2009-2014..	8
2	Fases del mecanismo del sistema CRISPR-Cas.	18
3	Frecuencia de aislamiento de las cepas identificadas como <i>A. baumannii</i> y origen de la muestra.	34
4	Porcentaje de cepas resistentes y sensibles a diferentes familias de antibióticos obtenidas a través de Vitek 2®, la clasificación se obtuvo con base en los criterios de la CLSI (2018).	36
5	Gel de agarosa al 1.8% en donde se observa la amplificación de los genes <i>bla</i> _{OXA-51} , <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-24} y <i>bla</i> _{OXA-58} .	38
6	Diagrama de Venn en donde se observan los genes que amplificaron las cepas del complejo Acb.	39
7	Alineamiento de las secuencias del gen <i>bla</i> _{OXA51} de las cepas 483H <i>A. baumannii</i> y 539U <i>A. pittii</i> .	42
8	Gel de agarosa al 0.75% para detección de perfiles de plásmidos en cepas de <i>A. baumannii</i> .	43
9	Esquema representativo de un gel de agarosa con corrimiento electroforético por campos pulsados (PFGE) de 11 cepas de <i>A. baumannii</i> tras restricción con Apal.	48
10	Dendrograma que muestra la diversidad genética de cepas del complejo Acb, determinadas por PFGE.	49
11	Análisis eBURST que muestra los grupos de ST obtenidos a través del protocolo Pasteur en las cepas del complejo Acb.	54
12	Análisis eBURST que muestra los grupos de ST relacionados y no vinculados con respecto a la ST758 en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> .	55
13	Gel de agarosa al 1.0% para la detección del sistema CRISPR-AYECas1 para 12 cepas del complejo Acb.	56
14	Gel de agarosa al 1.0% para la detección del sistema CRISPR-Cas IFb en cepas de <i>A. baumannii</i> .	57
15	Alineamiento de las secuencias del sistema CRISPR-AYECas1 de las cepas 94H <i>A. baumannii</i> y 433H <i>A. baumannii</i> .	58
16	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del sistema CRISPR-Cas IFb de las cepas 769H <i>A. baumannii</i> y 568H <i>A. baumannii</i> .	58
17	Búsqueda bioinformática del sistema CRISPR-Cas IFb de la cepa 769H <i>A. baumannii</i> .	59
18	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del sistema CRISPR-Cas IFb de las cepas 769H <i>A. baumannii</i> , 568H <i>A. baumannii</i> y <i>A. baumannii</i> AYE.	60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AFLP	del inglés (Estados Unidos) Amplified fragment length polymorphism
BLEES	Betalactamasas de Espectro Extendido
CC	Complejo Clonal
CRISPR	del inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTX-M-2, 43	Betalactamasa de Espectro Extendido con actividad hidrolítica a cefotaxima
DNA	del inglés Deoxyribonucleic Acid
ERV	<i>Enterococcus</i> vancomicino-resistente
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a glicopéptidos.
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención en Salud.
IIH	Infecciones Intrahospitalarias.
MALDI-TOF MS	del inglés Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
MBL	Metalo-Betalactamasa
MLST	del inglés Multilocus Sequence Typing
OD-PCR	PCR con oligonuceótidos degenerados
OMP	Proteína de Membrana Externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
Oxa	Oxacilinas
PCR	del inglés Polymerase Chain Reaction
PFGE	del inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
RNA	del inglés Ribonucleic Acid
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino-resistente
SAMS	<i>Staphylococcus aereus</i> meticilino-sensible
SHV-12	Betalactamasa de Espectro Extendido con actividad hidrolítica a cefotaxima
ST	Secuencia Tipo
TEM-1,3,92	Betalactamasa de Espectro Extendido con actividad hidrolítica a cefotaxima
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos.

RESUMEN

Acinetobacter baumannii es un patógeno nosocomial oportunista, aislado frecuentemente en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), causa neumonía asociada a ventilador, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, meningitis e infecciones en heridas. El objetivo de este estudio fue tipificar molecularmente las cepas del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* (*Acb*) procedentes de pacientes del HIMFG (Hospital Infantil de México Federico Gómez) por medio de perfil plasmídico, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), tipificación por secuencia multilocus (MLST) y el sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). En este estudio se incluyeron un total de 66 cepas de *A. baumannii*, aisladas en el período de enero de 2015 a febrero del 2017, principalmente de la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica 24% (n=16/66) y de muestras de sangre 47% (n=31/66). Las cepas identificadas previamente por el Vitek 2® como *A. baumannii*, fueron reidentificadas con el MALDI-TOF-MS- Biotyper, con este sistema se logró diferenciar entre las especies del complejo *Acb*, en donde, el 11% (n=7/66) de las cepas fueron identificadas como *A. pittii*, 4% (n=3/66) como *A. nosocomialis* y 85% (n=56/66) como *A. baumannii*. El 50% (n=33/66) de las cepas mostraron un perfil multidrogo resistente (MDR) y el 4.5 % (n=3/66) un perfil extemo drogo resistente (XDR). La presencia de los genes *bla*_{OXA} en las cepas analizadas se detectaron por PCR, todas las cepas amplificaron el gen *bla*_{OXA-51}, el 54% (n=36/66) el gen *bla*_{OXA-23}, el 4.5% (n=3/66) el gen *bla*_{OXA-24} y el 1.5% (n=1/66) *bla*_{OXA-58}. Los perfiles de plásmidos obtenidos a través de la técnica de Eckardt mostraron que las cepas presentaban de 1 a 7 plásmidos con un tamaño de entre 2.4 y 121 Kb. Los patrones de macrorestricción fueron obtenidos con la enzima de restricción *Apal*, generando entre 16 y 23 fragmentos, con un tamaño de 48 a 339 Kb. Acorde con los patrones de restricción las cepas se distribuyeron en ocho grupos (A-H) y se obtuvieron un total de 47 pulsotipos; dentro de los cuales se observan 15 subgrupos con un patrón de restricción idéntico y un coeficiente de correlación de 0.99. En este estudio se implento el método de secuenciación masiva para determinar la Secuencia Tipo (ST) de las cepas, los resultados mostraron un total de 16 ST, de las cuales la más prevalente fue la ST 156 (n=18/66), seguida de las ST 132 (n=7/66) , ST 1166 (n=4/66) y la ST 2 (n=4/66). Las cepas identificadas como *A. pittii*, presentaron las siguientes ST: 209, 667 y 870. Los sistemas AYECas1 y CRISPR-Cas IFb fueron identificados en las cepas de estudio mediante PCR. El 38% (n=25/66) de las cepas amplificó alguno de los sistemas, siendo el sistema CRISPR-AYECas1 el más prevalente con un 80% (n=20/25); mientras que el sistema CRISPR-Cas IFb sólo se identificó en el 8% (n=5/25). Las cepas del complejo *Acb* mostraron un alto grado de diversidad, las técnicas de tipificación molecular que brindaron mejor información en cuanto a la diversidad genética y epidemiología de las cepas fueron el PFGE y MLST.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an opportunistic nosocomial pathogen, most frequently isolated from intensive care unit (ICU), causes ventilator associated pneumonia, bacteremia, urinary tract infections, meningitis and wound infections. The aim of this study was to molecular typing the strains of the complex *A. calcoaceticus-baumannii* (*Acb*) from of patients of HIMFG (Children´s Hospital of Mexico Federico Gomez) by means of plasmid profile, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), typing by multilocus sequence (MLST) and CRISPR-Cas system (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). This study included a total of 66 strains of *A. baumannii*, isolated in the period from January 2015 to February 2017, were mainly from the Pediatric Intensive Care Unit 24% (n=16/66) and from blood samples 47% (n=31/66). The strains were initially identified by Vitek 2® as *A. baumannii*, thereafter were reidentified with MALDI-TOF-MS-Biotyper, with this system it was possible to differentiate between the species of the *Acb* complex, where the 11% (n=7/66) of the strains were identified as *A. pittii*, 4% (n=3/66) as *A. nosocomialis* and 85% (n=56/66) as *A. baumannii*. The 50% (n=33/66) of the strains showed a multidrug resistant profile (MDR) and 4.5% (n=3/66) an extensively drug resistant profile (XDR). The presence of *bla*_{OXA} genes in the analyzed strains was detected by PCR (Polymerase Chain Reaction), all isolates amplified the *bla*_{OXA-51} gene, 54% (n=36/66) the *bla*_{OXA-23} gene, 4.5% (n=3/66) the *bla*_{OXA-24} gene and 1.5% (n=1/66) *bla*_{OXA-58}. The plasmid profiles obtained through the Eckardt technique showed that the strains had from 1 to 7 plasmids with a size between 2.4 and 121 Kb. The patterns of macrorestriction were obtained with the restriction enzyme *Apal*, generating between 16 and 23 fragments, with a size of 48 to 339 Kb. According to the restriction patterns, the strains were distributed in eight groups (AH) and a total of 47 pulsotypes were obtained; within which 15 subgroups are observed with an identical restriction pattern and a correlation coefficient of 0.99. In this study we implemented the method of massive sequencing to determine the Type Sequence (ST), the results showed a total of 16 ST, the most prevalent was ST 156 (n=18/66), followed by ST 132 (n=7/66), ST 1166 (n=4/66) and ST 2 (n=4/66). The strains identified as *A. pittii* presented the following ST: 209, 667 and 870. The AYECas1 and CRISPR-Cas IFb systems were identified in the study by PCR. The 38% (n=25/66) of the strains amplified some of the systems, the CRISPR-AYECas1 system being the most prevalent with 80% (n=20/25); while the CRISPR-Cas IFb system was only identified in 8% (n=5/25). The strains of the *Acb* complex showed a high degree of diversity, the molecular typing techniques that provided the best information regarding the genetic diversity and epidemiology of the strains were the PFGE and MLST.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS).

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), anteriormente conocidas como infecciones nosocomiales o infecciones intrahospitalarias (IIH), son consideradas infecciones localizadas o sistémicas que se desencadenan a partir de una reacción adversa a la presencia de uno o varios agentes infecciosos o sus toxinas, sin que haya evidencia de su presencia previa al ingreso hospitalario (Unahalekhaka, 2011). Las infecciones que ocurren después de 48 hrs de ingreso al hospital, las que se desarrollan en los 30 días posteriores a un procedimiento quirúrgico y las que presentan los neonatos debido a su paso a través del canal de parto, también son consideradas como IAAS (NOM-026-SSA2-2005).

Los factores que favorecen estas infecciones son diversos; sin embargo, dependen principalmente de los microorganismos (patogenicidad, virulencia de las cepas y resistencia antimicrobiana), de la susceptibilidad del paciente (edad, sexo, enfermedades y estado inmunológico), del ambiente (personal hospitalario y régimen de visitas) y del tratamiento que se ha aplicado al paciente.

En hospitales pediátricos, el mayor riesgo para el desarrollo de IAAS se presenta en las unidades de cuidados intensivos neonatales y de adultos (Larracilla, 2000; Camacho *et al.*, 2004). Siendo las principales rutas de dispersión de paciente a paciente, las manos de cirujanos, vestimenta e instrumentos. En México la frecuencia de IAAS en unidades hospitalarias varía desde 2.1 hasta 15.8%; en donde, la probabilidad de desarrollar una IAAS es del 7% y de morir una vez que se adquiere dicha infección del 29% (López *et al.*, 2012).

Las IAAS generalmente pueden ser evitadas, siempre y cuando las instituciones sean capaces de establecer medidas de control y prevención para abatir los factores de riesgo, que puedan aumentar la frecuencia de dichas infecciones. Debido a lo anterior, se han desarrollado diferentes métodos que han permitido tipificar los microorganismos asociados a estas infecciones, con la finalidad de identificar las fuentes o vías responsables de las infecciones, permitiendo analizar la relación clonal entre las mismas.

Los agentes etiológicos que se han asociado con mayor frecuencia a las IAAS incluyen bacterias, virus, hongos y parásitos (Tabla 1). Dentro de las bacterias se encuentran: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus spp* y *Acinetobacter baumannii* (González, 2010).

Tabla. 1. Agentes etiológicos implicados en IAAS (Infecciones Asociadas a la Atención en Salud).

BACTERIAS	VIRUS	OTROS
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hepatitis A, B,C,TTV	<i>Candida spp.</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	VIH	Priones: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
<i>Clostridium difficile/Clostridium sordellii</i>	Influenza	<i>Aspergillus spp.</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Virus respiratorio sincicial	
<i>Staphylococcus aureus</i> : SAMS, SAMR hospitalario, SAMR comunitario, GISA	Parvovirus	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Rubéola	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	SARS coronavirus	
<i>Enterococcus spp</i> , incluyendo ERV y multi-resistentes	Rotavirus	
Enterobacterias multi-resistentes	Varicella	
<i>Legionella pneumophila</i>	Fiebres hemorrágicas	
	Norovirus	

SAMS: *S. aureus* meticilino-sensible; SAMR: *S. aureus* meticilino-resistente; GISA: *S. aureus* con resistencia intermedia a glicopéptidos; ERV: *Enterococcus vancomicina*-resistente. SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Severo.

1.2 *Acinetobacter spp.*

En 1911 Beijerinck describió un microorganismo aislado del suelo al que denominó *Micrococcus calcoaceticus*. Posteriormente, en 1954 Brisou y Prevot propusieron el género *Acinetobacter* (del griego “akinos”, es decir inmóvil) con la finalidad de diferenciar los microorganismos móviles de los inmóviles dentro del género *Achromobacter*, sin embargo, el género *Acinetobacter* fue reconocido oficialmente por el Subcomité de Taxonomía de

Moraxella y Bacterias en 1971. En 1974 se incluyó en el Manual de Bergey teniendo una sola especie (*Acinetobacter calcoaceticus*); actualmente se han designado más de 50 especies, dentro de las cuáles seis (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. dijkshoormiae*, *A. seifertii* y *A. calcoaceticus*) presentan un fenotipo similar, dificultando su diferenciación y agrupándose en el complejo denominado *A. calcoaceticus-baumannii* (Acb) (Harding *et al.*, 2017); siendo *A. baumannii* la especie mejor caracterizada.

El género *Acinetobacter* engloba bacilos Gram negativos, aerobios estrictos, no fermentadores, catalasa positivos y oxidasa negativos e inmóviles (Hernández *et al.*, 2010), con un contenido de G+C de 39 a 47% en su DNA; se encuentran ampliamente diseminados en la naturaleza, principalmente en agua y suelo. En gelosa sangre o agar soya tripticaseína, crecen formando colonias lisas, rara vez mucoides, de color blanco grisáceo (Peleg *et al.*, 2008).

Las especies que pertenecen a este género son consideradas como patógenos oportunistas, cobrando mayor relevancia por su asociación con las IAAS, especialmente en pacientes ubicados en las unidades de cuidados intensivos. Las principales infecciones que causa son: neumonía asociada al ventilador, endocarditis, meningitis e infecciones de la piel, tejidos blandos y tracto urinario (Moradi *et al.*, 2015). Las especies de importancia clínica en este género son: *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. baumannii*, siendo la última la de mayor importancia epidemiológica (Vila, 2008). *A. baumannii* tiene tropismo a tejidos húmedos, tales como las membranas mucosas o áreas de piel expuestas por lesiones. Se aísla con mayor frecuencia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), en donde es causa de infecciones severas tales como: neumonía asociada a ventilador, infección en torrente sanguíneo, infección en tracto urinario, meningitis e infección en heridas. En el caso de infecciones en heridas, se cree que otros patógenos como *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* contribuyen a crear una vía de entrada en el torrente sanguíneo para *A. baumannii*, ya que estos son capaces de crear infecciones necrosantes (Sebeny *et al.*, 2008). Además, este microorganismo tiene la capacidad de adherirse y formar biopelículas sobre superficies de objetos inanimados, lo que explica parte de su prevalencia en entornos hospitalarios. Forma parte del grupo ESKAPE junto con *Enterobacter* spp, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. faecium*, caracterizándose por evadir la acción de los antibióticos (Gutiérrez *et al.*, 2017).

Actualmente *A. baumannii* es considerada una de las especies bacterianas más difíciles de contener en un ambiente hospitalario, debido a la dispersión clonal de cepas clínicas que facilita su transmisión de persona a persona y la contaminación de superficies inertes; además, las infecciones que produce son difíciles de tratar debido a la resistencia intrínseca y adquirida que posee a las diferentes familias de antibióticos. *A. baumannii* es resistente intrínsecamente a penicilinas, cefalosporinas y fluoroquinolonas, siendo los carbapenémicos el tratamiento de elección para infecciones adquiridas por este microorganismo; sin embargo, actualmente las opciones terapéuticas son limitadas debido al incremento en la resistencia a carbapenémicos, como resultado de la dispersión de clonas productoras de betalactamasas de espectro extendido; siendo la colistina y polimixina B la única opción terapéutica. Motivo por el cual, las cepas que muestran resistencia a carbapenémicos son clasificadas como altamente resistentes, limitando las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones originadas por este patógeno (Morejón, 2013).

En el año 1986 se registró el primer brote por *A. baumannii*, controlado fácilmente utilizando B-lactámicos y sulfonamidas. A finales de la década de los 90's en Asia y América Latina se registraron brotes causados por cepas multiresistentes de *A. baumannii*; implementado el uso de técnicas para tipificar las cepas, estrategias que permitieran su control y creación de redes de vigilancia multinacionales (González y Valverde, 2016). En México está a cargo la RHOVE (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica), la cual reporta a *A.baumannii* dentro de los primeros 5 agentes implicados en IAAS (Tabla 2); con una tendencia ascendente en los aislados de dicho microorganismo (Figura 1).

Tabla 2. Principales agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) en unidades RHOVE (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica), México 2014.

Agente etiológico	Total (N=32,975)	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	6,063	18.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,217	12.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,819	8.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,401	7.3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,124	6.4
<i>Staphylococcus epidermis</i>	1,955	5.9
<i>Candida albicans</i>	1,878	5.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,270	3.9
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,075	3.3
<i>Staphylococcus hemolyticus</i>	879	2.7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	594	1.8
<i>Enterococcus faecium</i>	398	1.2
<i>Candida tropicalis</i>	368	1.1
<i>Serratia marcescens</i>	311	0.9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	264	0.8
<i>Proteus mirabilis</i>	240	0.7
<i>Citrobacter freundii</i>	201	0.6
<i>Candida parapsilosis</i>	199	0.6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	193	0.6
<i>Candida glabrata</i>	185	0.6
<i>Morganella morganii</i>	139	0.4
<i>Clostridium difficile</i>	135	0.4
<i>Candida krusei</i>	125	0.4
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	107	0.3
<i>Burkholderia cepacia</i>	72	0.2
<i>Trichosporon asahii</i>	39	0.1
Otros	4,724	14.3

*Otros (95 agentes): *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Staphylococcus warneri*, *Achromobacter xylosoxidans*, etc. **Identificación de toxina. Tomado de la RHOVE, 2015 (Secretaría de Salud)

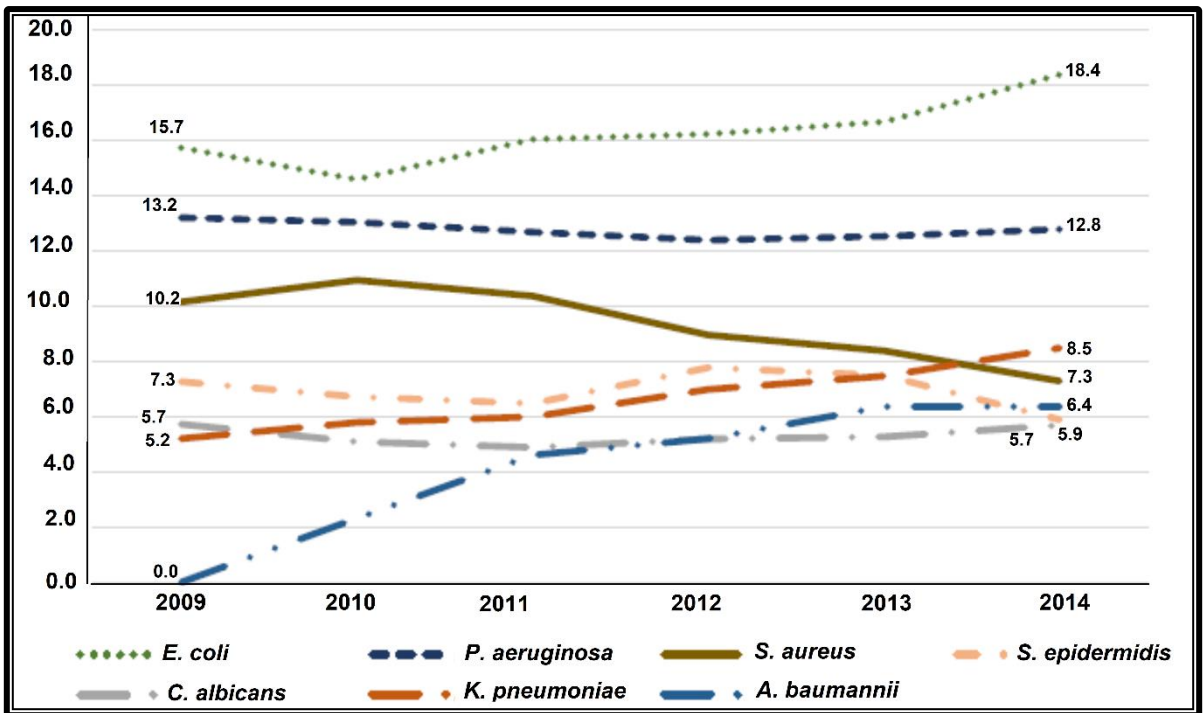


Figura 1. Proporción de microorganismos aislados en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), Unidades RHOVE (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica). México 2009-2014.

A. baumannii además de asociarse al desarrollo de IAAS también está incluida dentro de la lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos, publicada por la OMS; considerándose como un microorganismo con prioridad alta; debido a la resistencia que ha adquirido a diferentes antibióticos como carbapenémicos y cefalosporinas (WHO, 2017).

1.2.1 Mecanismos de resistencia en *A. baumannii*.

El principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos en *A. baumannii* es la degradación enzimática por betalactamasas; sin embargo, existen múltiples mecanismos que a menudo trabajan en conjunto para producir el mismo fenotipo, tales como las modificaciones de proteínas fijadoras de penicilina, inactivación enzimática, alteración de la permeabilidad por reducción de porinas o bien por la eliminación del antibiótico a través de bombas de expulsión (Carrillo y García, 2007).

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEES) se encuentran principalmente codificados en plásmidos; sin embargo, existen algunas betalactamasas cromosómicas que también pueden conferir fenotipos de resistencia (Álvarez, 2010). Estas enzimas se pueden

diseminar entre cepas de la misma especie o bien entre especies diferentes. En *A. baumannii* se han identificado islas de resistencia (AbaR1), las cuales se cree se originaron a partir de otros microorganismos Gram-negativos, en dichas islas se localizan diferentes genes de resistencia.

Existen diversas BLEES identificados en *A. baumannii*: TEM-1, TEM-3, TEM-92, SHV-12, CTX-M-2 y CTX-M-43 (presentan actividad hidrolítica a cefotaxima). En *A. baumannii* la presencia de una secuencia de inserción (ISAba1), está correlacionada con el aumento de la expresión de genes *ampC* y resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (Heritier *et al.*, 2005). En el caso de las betalactamasas, las que presentan actividad carbapenemasas son las oxacilinasas (Oxas) y las metalo-betalactamasas (MBLs).

Los genes *bla*_{Oxa-23}, *bla*_{Oxa-24}, *bla*_{Oxa-51} y *bla*_{Oxa-58} son los responsables de la resistencia a carbapenémicos. Las Oxas tienen la capacidad de hidrolizar oxacilina y pueden estar codificadas en plásmidos, el primer grupo identificado en *A. baumannii* fue ARI-1 (*Acinetobacter* Resistente a Imipenem) nombrado más tarde como gen *bla*_{Oxa-23}, el cual contribuye a la resistencia a carbapenémicos a nivel mundial (Evans y Amyes, 2014). Las carbapenemasas de la familia OXA-23 están conformadas por las variantes OXA-27 y OXA-49 (Tabla 3); sin embargo, existen otras familias como la OXA-58 que, a pesar de haber sido descritas recientemente, muestran una amplia distribución. La OXA-51 es de localización cromosómica y su papel en la resistencia a carbapenémicos está relacionada con la presencia de ISAba1 (Turton *et al.*, 2006).

La detección temprana de carbapenemasas es importante porque los genes que codifican para estas enzimas se encuentran localizados usualmente en determinantes genéticos, como los plásmidos que permiten su rápida diseminación, por lo que evidenciar las características genotípicas en una población de cepas de *A. baumannii*, permite ejecutar medidas para su control.

Tabla. 3. Carbapenemasas de la familia OXA (betalactamasas).

GRUPO	ENZIMA (FAMILIA)	MIEMBROS ADICIONALES (OXA)
1	OXA-23	OXA-27,OXA-49
2	OXA-24	OXA-25,OXA-26,OXA-40,OXA-72
3	OXA-51	OXA-64 a OXA-71, OXA-75 a OXA-78,OXA-83,OXA-84,OXA-86 OXA-89,OXA-91,OXA-92,OXA-94,OXA-95
4	OXA-58	Ninguna
5	OXA-55	OXA-SHE
6	OXA-48	OXA-54,OXA-SAR2
7	OXA-50	OXA-50 ^a -OXA-50d
8	OXA-60	OXA-60 ^a -OXA-60d,
9	OXA-62	Ninguna

Tomado de Evans y Amyes, 2014.

Las MBL (metalo-betalactamasas) suelen ser menos comunes en *A. baumannii*; sin embargo, su actividad es más eficaz, ya que tienen la capacidad de hidrolizar todos los betaláctamicos incluyendo carbapenémicos. Las MBL se encuentran codificados en integrones clase 1, los cuales contienen una serie de cassettes de genes de resistencia, facilitando su adquisición y expresión (Walsh *et al.*, 2005; Maleki *et al.*, 2014).

La resistencia a antibióticos en *A. baumannii* también se debe a mecanismos no enzimáticos, los cuales incluyen cambios en las proteínas de membrana externa (OMPs), bombas de eflujo y alteraciones en la afinidad (Damier *et al.*, 2008; Wieczorek *et al.*, 2008; Smani *et al.*, 2014). La presencia de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos dentro de integrones de clase 1, son altamente prevalentes en cepas de *A. baumannii* resistentes a múltiples fármacos. La resistencia a quinolonas, está se encuentra mediada por plásmidos; la resistencia a tetraciclina y sus derivados se encuentra mediada por bombas de eflujo, codificadas por los determinantes *tet (A)* o *tet (E)*, dentro de un transposón conocido como Tn1721 asociado con un elemento ISA (Lin *et al.*, 2009)

Los integrones son comunes en cepas de *A. baumannii* que presentan un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, las cuáles son consideradas como cepas panresistentes, debido a que presentan resistencia a todos los antibióticos de primera línea que tienen potencial terapéutico contra este patógeno.

Otra característica importante de *A. baumannii* es que tiene la capacidad de sobrevivir en superficies ambientales con poca disponibilidad de agua, de 13 a 20 días; esta

capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo aunado a su capacidad de resistencia a diversos antibióticos, han contribuido al éxito de este patógeno nosocomial. Siendo indispensable entender la habilidad de diseminación y presencia de diferentes patrones de resistencia en clonas de *A. baumannii*, debido a que una vez que es introducida en un hospital, puede persistir y ser endémica.

1.3 Técnicas de tipificación.

Los sistemas de tipificación molecular permiten reconocer la relación entre aislados vinculados epidemiológicamente. La aplicación de estas técnicas y herramientas son de suma importancia en estudios de infecciones nosocomiales, principalmente en hospitales con unidades de terapia intensiva, neonatología, hematología u oncología, ya que ingresan pacientes susceptibles a adquirir IAAS (Coll *et al.*, 2005).

Las técnicas de tipificación se han clasificado en fenotípicas, es decir, basadas en características bioquímicas o fisiológicas de los microorganismos; y en genotípicas o moleculares, que se basan en el estudio del DNA (Singh *et al.*, 2006). Los métodos moleculares de tipificación pueden utilizar como diana tanto DNA cromosómico como DNA de elementos genéticos móviles de transmisión horizontal, es decir, plásmidos, transposones, integrones y secuencias de inserción. Estas técnicas se clasifican en 3 grupos, las que se basan en el estudio de perfiles de restricción del DNA, las que implican la amplificación de secuencias de DNA mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y las que se basan en la secuenciación parcial de genes.

Las técnicas de tipificación molecular son útiles en la vigilancia y control de brotes permitiendo conocer la clonalidad entre cepas, identificar reservorios y determinar vías de transmisión (Fernández *et al.*, 2011). Además, se pueden aplicar a un mayor número de especies microbianas, son más reproducibles y por lo tanto tienen mayor poder de tipificación y discriminación.

Cuando se requiere analizar brotes epidémicos en taxones que son muy homogéneos, es necesario utilizar marcadores que nos permitan discriminar y reconocer los aislados no relacionados a la cepa epidémica.

Existen diferentes criterios que permiten evaluar la eficacia de los marcadores moleculares, tales como:

- Tipabilidad: proporción de cepas que se clasifican como pertenecientes a un tipo determinado.
- Reproducibilidad: capacidad del marcador para clasificar una cepa en el mismo tipo cuando se realizan varios ensayos independientes.
- Estabilidad: capacidad del marcador para reconocer la relación clonal existente entre cepas.
- Poder discriminativo: probabilidad de que el marcador clasifique en dos tipos distintos a dos cepas que no están relacionadas, las cuales son seleccionadas al azar en la población de un determinado taxón. (Coll *et al.*, 2005).

1.3.1 MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

Uno de los métodos más empleados en la identificación bacteriana es la espectrometría de masas, específicamente el MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Debido a que es un método rápido, se ha implementado con fines de identificación bacteriana, tipificación de cepas y estudios epidemiológicos. Utiliza proteínas ribosomales para la identificación de microorganismos, estableciendo relaciones a nivel de género y hasta especie (Fagerquist, 2017).

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la cual la muestra es ionizada en moléculas cargadas, para medir la relación masa y carga (m/z); esta ionización es por desorción láser asistida por matriz (MALDI), donde los péptidos son convertidos en iones a través de la adición o pérdida de uno o más protones (Croxatto *et al.*, 2012).

Para llevar a cabo esta técnica, la muestra debe ser colocada en una placa de metal pulido (es reutilizable) donde es revestida con un compuesto orgánico absorbente de energía, conocido como matriz (solución saturada de ácido-ciano-4-hidroxicinámico, acetonitrilo y ácido trifluoroacético), teniendo como función el exponer las proteínas intracelulares a través de la rotura de la membrana celular y facilitar la vaporización e

ionización de las proteínas mediante un haz de láser; lo que va a generar iones protonados de la muestra (Singhal *et al.*, 2015). Posteriormente, las proteínas ionizadas se aceleran por una cámara de vacío, donde son detectadas al final de esta, para ser separadas con base en la relación de masa/carga (m/z). Los analitos que se detectan se miden utilizando diferentes tipos de analizadores de masa, como cuadrupolo o triple cuadrupolo, trampa de iones, cuadrupolo con tiempo de vuelo TOF (Q-TOF) o analizadores de tiempo de vuelo (TOF).

En un análisis empleando MALDI-TOF, la relación masa/carga del ión se mide determinando el tiempo que requiere para viajar a lo largo del tubo de vuelo; con esta información se generará un espectro, que será comparado en la base de datos del software del equipo; lo anterior es posible, debido a que cada microorganismo presenta una serie de picos característicos en el espectro, los cuales permiten generar bases de datos y emitir un puntaje de similitud con los espectros contenidos en la base de datos. Un aspecto importante es que en los espectros que se obtienen, el eje x describe la relación masa-carga y en el eje y se presenta la abundancia relativa, es decir entre más altos los picos más abundantes es la sustancia en la muestra, como es el caso de las proteínas ribosomales.

1.3.2 Perfil de DNA plasmídico.

Las bacterias además de presentar DNA cromosómico, también pueden tener DNA extracromosómico denominado DNA plasmídico. Los plásmidos son considerados moléculas de DNA de doble cadena, circular o lineal; pueden presentar una longitud variable y forman del 1 al 10% del genoma de las bacterias (Betancor *et al.*, 2008). Constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma; por lo tanto, poseen regiones constantes que incluyen determinantes genéticos para funciones esenciales, ya sea de replicación, mantenimiento o transferencia; así mismo, contienen genes que confieren resistencia, virulencia o actividades metabólicas, poseen también una región variable de DNA, asociada generalmente a genes de resistencia.

El número de plásmidos en una bacteria puede variar, desde una sola copia hasta cientos por célula, generalmente los plásmidos de tamaño pequeño se presentan en un número elevado de copias y los de gran tamaño en un número reducido (generalmente 1 o

2) (Betancor *et al.*, 2008). Se sabe que los plásmidos se pueden encontrar en idéntico número, tamaño y peso molecular en bacterias con diferentes orígenes; debido a lo anterior, se ha implementado el análisis de los perfiles de plásmidos como una técnica para el estudio de brotes causados por diferentes géneros de bacterias. La técnica de perfiles de plásmidos es sencilla de realizar, requiere de la extracción de plásmidos mediante una lisis celular alcalina, y posteriormente los mismos son separados mediante electroforesis en gel de agarosa. Los perfiles que se generan son comparados en función del número de bandas de DNA plasmídico y sus tamaños; sin embargo, es importante mencionar que es una técnica con un bajo poder de discriminación, debido a los diferentes métodos que se implementan para la extracción del DNA plasmídico, haciendo énfasis en aquellas técnicas en las que se emplean métodos con los que es difícil de separar plásmidos de gran tamaño (megaplásmidos) mediante electroforesis (Fernández *et al.*, 2013).

En epidemiología se ha implementado esta técnica con la finalidad de determinar el número y tamaño de megaplásmidos y plásmidos de bajo peso, ya que se considera que las cepas que pertenecen a la misma clona tendrán plásmidos idénticos en número, tamaño y patrones de restricción.

Una desventaja de esta técnica es que la interpretación de los perfiles de plásmidos no es sencilla, pues como ya se mencionó anteriormente, en función de los métodos de extracción de plásmidos, se pueden obtener diferentes formas del mismo plásmido (superenrollada, circular o lineal), las cuales presentarán movilidades electroforéticas distintas y difíciles de distinguir; sin embargo, se han implementado técnicas que incorporan el empleo de una enzima de restricción que ayuda a eliminar las isoformas de los plásmidos (Barton *et al.*, 1995).

1.3.3 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis).

El término de electroforesis en gel por campo pulsado fue acuñado por Schwartz y Cantor en el año 1984 para referirse a cualquier separación en gel que implicase el empleo de campos eléctricos múltiples y alternos. Con lo anterior lograron que moléculas grandes

de DNA se separaran. Es una técnica altamente discriminatoria, teniendo por lo tanto una amplia aceptación (Cardozo *et al.*, 2013).

El método de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis, de acuerdo a sus siglas en inglés) es una herramienta de tipificación molecular que permite la separación de fragmentos de DNA de alto peso molecular (10 Kb – 10 Mb). En este método, el DNA viaja a través de un gel de agarosa concentrado, bajo la influencia de dos campos eléctricos. Los fragmentos son sometidos a varios campos eléctricos de distinta orientación, al aplicarse el primero durante cierto tiempo, los fragmentos se estiran y se orientan según la dirección de dicho campo; si se aplica un segundo campo perpendicular al anterior, se obliga a los fragmentos de DNA a relajarse, elongarse y alinearse de acuerdo con este segundo campo eléctrico. En concentraciones altas de agarosa y con tensiones elevadas, las moléculas grandes de DNA son elongadas a lo largo de la dirección del campo eléctrico con la finalidad de penetrar a través de los poros del gel; por lo tanto, cuanto más grande sea la molécula de DNA, mayor será el tiempo para encontrar la orientación y retención en el gel (Cardozo *et al.*, 2013).

Los patrones de restricción de DNA de los aislados pueden ser comparados para determinar su relación. Lo que se busca con esta técnica es que las cepas se puedan distinguir de una a otra, y que, por lo tanto, difieran de la cepa que no está relacionada.

Los eventos genéticos como mutaciones, deleciones e inserciones alteran el patrón de PFGE durante el curso. Primero se examinan los patrones de brotes, si estos presentan un patrón común, entonces es más probable que estén relacionados. El tamaño y número de fragmentos en el patrón son comparados con los fragmentos que conforman los otros aislados (Tenover *et al.*, 1995). Se compara fragmento por fragmento, cada patrón de aislado es entonces clasificado por su parentesco al patrón de brote. Una cepa control (bien caracterizada) debe ser procesada junto con los aislados desconocidos (Southern *et al.*, 1987). Debe utilizarse un patrón de tamaño de peso molecular en al menos un carril del gel para tener una orientación acerca del tamaño de los fragmentos. Se necesita un estándar para evaluar diferencias menores que resultan de eventos genéticos (deleciones, inserciones o mutaciones). Los tamaños moleculares de los fragmentos desconocidos pueden ser determinados por el trazado de la distancia de migración.

1.3.4 MLST (Multilocus Sequence Typing)

Otro método epidemiológico de tipificación molecular es el MLST (Multilocus Sequence Typing), es el método por elección, basado en la comparación de las secuencias analizadas del *loci* de siete genes constitutivos, permite demostrar la presencia de cepas que comparten perfiles alélicos similares, aunque obtenidos de diferentes países. La secuencia tipo (ST) se refiere a un perfil alélico particular y a un complejo clonal (CC) refiriendo a un grupo de STs relacionadas y que comparten los mismos alelos por los menos 5/7 o 6/7 del loci (Maiden *et al.*, 1998; Maiden *et al.*, 2013). Por lo tanto, una ST o CC representa una clona sólo cuando este se incluye en las cepas sin relación epidemiológica. Sin embargo, la identificación de las clonas potencialmente patógenas sigue siendo un problema.

Esta técnica se ha empleado para identificar clonas y/o líneas clonales. Se basa en el principio desarrollado en el análisis de isoenzimas (Multilocus Enzyme Electrophoresis), en el cual se observa la movilidad electroforética de un número específico de enzimas. El análisis se inicia con la amplificación y la secuenciación de los fragmentos variables de los 7 genes que se seleccionen. Las secuencias son alineadas con las ya existentes en bases de datos, asignando entonces un número que identifique a cada alelo. Si la secuencia coincide, se asigna uno de los alelos ya identificado, por el contrario, se asignará un nuevo número si es un nuevo alelo. Las variaciones corresponden con variaciones en el locus o gen que codifica para cada enzima, por lo que cada una de esas variantes es definida como variante alélica y a su vez los alelos de cada gen conforman un perfil alélico (Coll *et al.*, 2005).

Esta técnica caracteriza los aislados detectando polimorfismos por secuenciación del DNA en los diferentes genes seleccionados; con lo anterior se pueden identificar todas las variaciones, ya que las regiones de los genes son responsables de la mayor parte de la variabilidad, pues el resto del locus presenta un alto grado de conservación.

1.3.5 Sistema CRISPR-Cas.

El sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, de acuerdo a sus siglas en inglés), se ha asociado a la adquisición de material genético móvil, es descrito como un mecanismo adaptativo de inmunidad y resistencia

utilizado por bacterias (Jansen *et al.*, 2002). Este locus contiene los espaciadores adquiridos de virus, plásmidos o cualquier material genético; por lo que se ha considerado como un sistema de inmunidad contra elementos móviles genéticos. Junto a este sistema se encuentra un conjunto de genes *cas* asociados, que son esenciales para la actividad del CRISPR, por lo que es denominado CRISPR-Cas. A través de análisis de genómica comparativa se han descrito más de 45 familias de genes *cas*; siendo *cas1* y *cas2* las que están presentes en las 45 familias de genes implicados en la adquisición de espaciadores; a su vez existen 7 tipos principales de sistemas CRISPR, los cuales pueden dividirse en 10 subtipos, cada una de estas clases contiene diferentes conjuntos de genes y patrones de repetición (Waddington *et al.*, 2016), cada uno de los anteriores posee una secuencia Cas específica (Barrangou, 2013), por ejemplo:

- Tipo I: Cas3
- Tipo II: Cas9
- Tipo II: Cas10

El sistema tipo I contiene el gen *cas3*, el cual codifica para una proteína independiente de las actividades helicasa y DNasa (HD), donde la escisión en el DNA se encuentra catalizada por el dominio HD del gen *cas3*. El sistema tipo II se encuentra asociado al gen *cas9* y el tipo III posee una proteína Cas10 que puede ser dirigido a secuencias de DNA o RNA. Además de estos tres tipos de sistema CRISPR, se han incorporado 2 nuevos tipos: IV y V.

El loci CRISPR consiste en dos componentes: un RNA guía (gRNA) y una endonucleasa no específica asociada a Cas. El gRNA es un RNA corto sintético compuesto de una secuencia andamio, necesaria para la unión de *cas* y un espaciador, aproximadamente ~ 20 nucleótidos o secuencia blanco la cual define el blanco genético para ser modificado. El mecanismo del sistema CRISPR-Cas presenta tres fases principales; la primera es conocida como adquisición, donde los elementos portadores de material genético son identificados como agentes invasivos a través del reconocimiento en su secuencia de un fragmento, conocido como protoespaciador, el anterior es cortado e integrado al locus CRISPR, justo en el extremo 5' seguido de la secuencia líder. Posteriormente, en un proceso de expresión, las secuencias que son agregadas al locus CRISPR son reconocidas como espaciadores, expresándose en forma de transcritos de RNA primario o pre-crRNA, siendo cortados en fragmentos más pequeños (crRNA) a través

de endonucleasas; cada uno de los fragmentos contiene un espaciador y una repetición parcial (Waddington *et al.*, 2016). Finalmente, en la etapa de interferencia, cuando la bacteria recibe material genético exógeno, el crRNA acompañado de proteínas Cas, se une por complementariedad de bases a la secuencia previamente adquirida, señalizando a las nucleasas que el elemento genético externo debe ser cortado (Figura 2) (Bhaya *et al.*, 2011).

Los sistemas CRISPR-Cas se han utilizado como una herramienta para tipificar la diversidad bacteriana; utilizando estos sistemas con fines de genotipificación y epidemiología (Grissa *et al.*, 2008; Fabre *et al.*, 2012). Si bien en algunos géneros de bacterias estos sistemas son muy diversos, se ha logrado complementar información obtenida a través de herramientas como PFGE , MLST y presencia de CRISPR-Cas con la finalidad de realizar una correcta subtipificación de cepas.

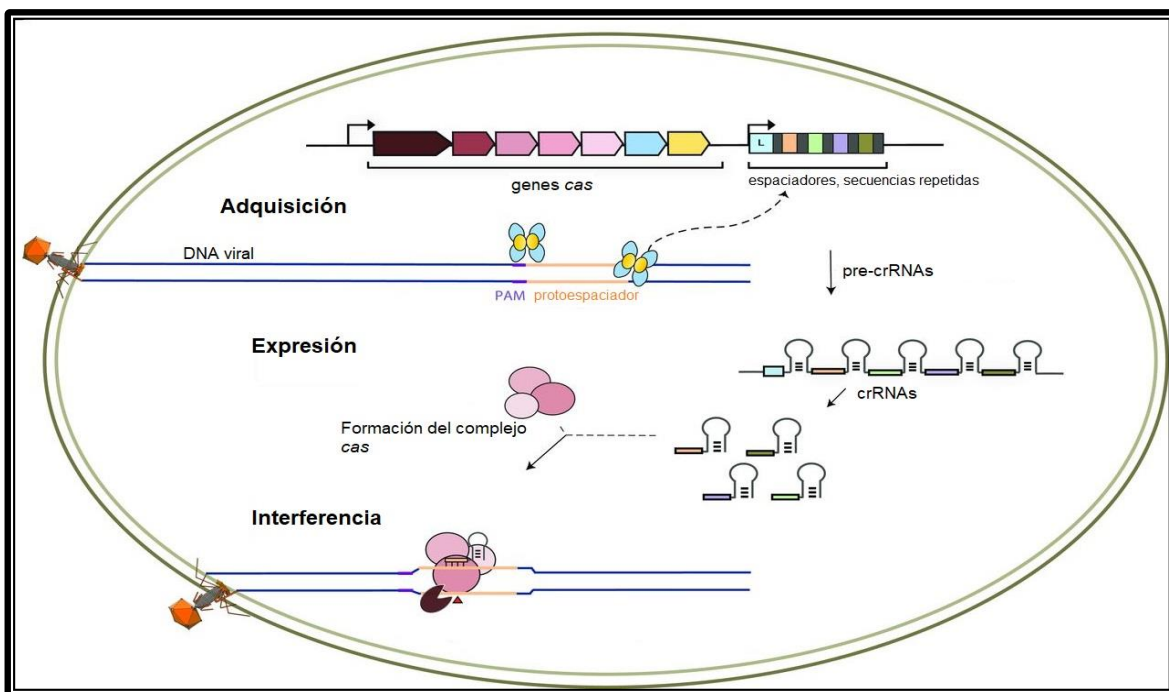


Figura 2. Fases del mecanismo del sistema CRISPR-Cas. Tomado de Mohanraju *et al.*, 2016 y modificado por Mancilla, 2019.

2. ANTECEDENTES

La epidemiología molecular ha permitido generar mayor conocimiento sobre las bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades infecciosas. Los métodos moleculares son diversos; sin embargo, desde el punto de vista metodológico, se clasifican en tres grandes grupos.

1. Aquellos basados en el estudio y comparación de un segmento del genoma o del genoma completo.
2. Los relacionados con la amplificación de fragmentos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
3. Las que involucran la secuenciación parcial o completa del genoma de los microorganismos.

En el caso de *A. baumannii* se han evaluado diferentes métodos fenotípicos y genotípicos con la finalidad de caracterizar los brotes asociados a dicho microorganismo. Dentro de estos métodos se han incluido PCR con oligonucleótidos degenerados (OD-PCR), REP-PCR (PCR basada en Secuencias Extragenómicas Repetitivas), electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), MLST (Multilocus Sequence Typing), rep-PCR, Spa Typing, amplificación de fragmentos de longitudes polimórficas AFLP, ribotipificación y ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos. Existen estudios donde al comparar los resultados obtenidos a través de las técnicas antes mencionadas, se ha encontrado que entre los métodos de mayor poder discriminatorio se encuentran la OD-PCR y PFGE; así mismo, se determinó que si se combinan ensayos de susceptibilidad con cada método genotípico, la combinación de esto con OD-PCR y antibiograma fueron los métodos más apropiados para el estudio epidemiológico de *A.baumannii*, permitiendo inferir relaciones genéticas y diseminación de clones (Limansky *et al.*, 2004).

Dentro de los métodos genotípicos, PFGE, MLST y AFLP han sido de los más utilizados para la tipificación de aislados clínicos. En un estudio realizado en hospitales de España y Alemania se identificaron a través de MLST un total de 20 perfiles alélicos o secuencias tipo, estos resultados concordaron con los generados por electroforesis en gel de campo pulsado, con lo anterior se ha determinado que el MLST es una herramienta útil para el estudio epidemiológico molecular de cepas clínicas de *A. baumannii* (Bartual *et al.*, 2005).

En otro estudio determinaron las relaciones entre aislados clínicos mediante la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) revelando que los aislados no estaban estrechamente relacionados, contrario a lo obtenido con la amplificación del gen *bla*_{OXA-51}, en donde identificaron dos grupos estrechamente relacionados (Evans *et al.*, 2008).

Actualmente se ha propuesto al sistema CRISPR-Cas para realizar la tipificación de aislados clínicos. Dos sistemas CRISPR-Cas en aislados de *A. baumannii* provenientes de hospitales militares e infantiles han sido identificados: sistema CRISPR-AYECas1 y sistema *A. bayli* ADP), permitiendo la agrupación de estos aislados en dos complejos clonales, además de brindar información acerca de la evolución de dichos complejos (Hauck *et al.*, 2012). En el año 2015 proponen el sistema CRISPR-Cas IFb como método para la subtipificación de cepas, permitiendo dar un seguimiento de la ruta de origen y diseminación de estas cepas. Dicho sistema fue identificado en cepas de *A. baumannii*, a través de la historia evolutiva de este sistema determinaron la relación genética entre aislados clínicos, basándose en el análisis de los espaciadores (Karah *et al.*, 2015).

Recientemente se ha utilizado la secuenciación del genoma para caracterizar y establecer las relaciones genéticas entre aislados. En un estudio donde se analizaron 148 cepas clínicas del complejo Acb por medio de PFGE, MLST y análisis de SNP, se determinaron diferentes grupos clonales; los resultados obtenidos a través de la secuenciación fueron más discriminatorios en comparación con los obtenidos por PFGE y MLST para la identificación de clones y su asociación con brotes (Fitzpatrick *et al.*, 2016). En otros estudios donde se ha implementado la secuenciación del genoma para la tipificación de cepas del complejo Acb, esta herramienta en conjunto con la amplificación del gen *gyrB* (DNA girasa subunidad B) y PFGE ha permitido determinar que existen eventos de infección y transmisión de estas cepas que pueden ser independientes (Wendel *et al.*, 2018). Recientemente, se demostró que 5 cepas que fueron aisladas del mismo paciente con un origen de aislamiento diferente, poseían un perfil idéntico de plásmidos, resistencia y ST y diferían únicamente en el pulsotipo, agrupándolos en dos grupos. Para definir si las cepas eran la misma, se realizó la secuenciación de los cinco genomas; encontrando que a pesar de estar altamente relacionadas, las características de los SNVS (Variaciones de un solo nucleótido) indican que son cepas diferentes; sugiriendo que más de dos cepas podrían estar causando una infección en el mismo paciente (Mancilla *et al.*, 2019); lo anterior brinda información acerca de las características ecológicas y específicas

de cada microorganismo, ya que de acuerdo con Fraser y *et al* (2009), son los genes accesorios los que determinan la diversidad en los organismos, brindándoles atributos únicos; siendo de suma importancia el conjuntar las técnicas de secuenciación masiva de genoma a nivel epidemiológico, con la finalidad de entender mejor la diversificación y comportamiento de estas cepas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) producen altas tasas de morbilidad y mortalidad. En México, se estima que la frecuencia de dichas infecciones en unidades hospitalarias varía de 2.1 a 15.8%. Dentro de los agentes etiológicos asociados a estas infecciones se encuentra el género *Acinetobacter*, siendo las especies de relevancia clínica. *A. nosocomialis*, *A. pittii* y *A. baumannii*, esta última asociada a una mayor mortalidad y prevalencia, la dispersión que presenta este microorganismo favorece no sólo su transmisión, sino también su prevalencia en entornos hospitalarios; además, puede presentar factores de virulencia que favorezcan su establecimiento y su difícil erradicación del área hospitalaria. Por lo tanto, es imperativo contar con métodos moleculares que permitan la caracterización de estas cepas y determinar si han persistido en áreas específicas a lo largo de un período de 2 años en el HIMFG.

4. JUSTIFICACIÓN

Acinetobacter baumannii es la principal especie implicada en el desarrollo de IAAS, la dispersión clonal que presenta este microorganismo favorece no sólo su transmisión, sino también su prevalencia en entornos hospitalarios; además, pertenece al complejo Acb (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. dijkshoormiae*, *A. seifertii* y *A. calcoaceticus*) dificultando su diferenciación por pruebas fenotípicas; por lo tanto, se propone el empleo de diferentes métodos de tipificación molecular, dentro de los que se incluyen: PFGE, MLST, perfil de plásmidos y sistema CRISPR-Cas, para determinar cuál de los anteriores podría aplicarse de manera eficaz para la tipificación y caracterización de las cepas del complejo Acb, así como, con la finalidad de establecer la importancia epidemiológica de cada una de las especies en las infecciones asociadas a este género.

5. HIPÓTESIS

Si las técnicas perfil de plásmidos, Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE), Tipificación por Secuencia Multilocus (MLST) y el sistema CRISPR-Cas son herramientas útiles en la tipificación molecular, entonces, la implementación y comparación de estas permitirá una certera identificación de aislados del complejo Acb (*A. calcoaceticus* - *A. baumannii*) y determinar la presencia de clonas persistentes en el área hospitalaria.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Tipificar molecularmente las cepas del complejo *Acb* procedentes de pacientes del HIMFG (Hospital Infantil de México Federico Gómez) por medio de ensayos de perfil de plásmidos, electroforesis en gel de campos pulsados, tipificación por secuencia multilocus (MLST) y el sistema CRISPR-Cas.

6.2 Objetivos particulares

1. Identificar los aislados de estudio en el equipo MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry).
2. Detectar los genes *bla_{OXA}* (*bla_{OXA}-51*, *bla_{OXA}-23*, *bla_{OXA}-24* y *bla_{OXA}-58*) en las cepas del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*- (*Acb*).
3. Determinar los perfiles de DNA plasmídico en las cepas *Acb*.
4. Determinar la similitud genética entre las cepas *Acb* mediante ensayos de PFGE.
5. Determinar las secuencias tipo (ST) de las cepas *Acb* mediante MLST.
6. Identificar el sistema CRISPR-Cas en las cepas *Acb*.

7 METODOLOGÍA.

7.1 Material biológico.

Las cepas identificadas como Acb causantes o no de infecciones nosocomiales obtenidas en el período del 1^o de enero 2015 al 1^o de febrero 2017 en pacientes del HIMFG fueron incluidas en este estudio. El perfil de susceptibilidad a antibióticos de estas se llevó a cabo con el sistema automatizado Vitek 2[®] (BioMeriux, Marcy l'Étoile Francia). Las cepas se sembraron en agar sangre Brucella (BD Difco, Madrid, España) y se conservaron en caldo Luria Bertani (LB) (BD Difco, Madrid, España) con glicerol al 20% a -70°C, hasta su uso.

7.2 Identificación de aislados del complejo Acb en el equipo MALDI-TOF MS-Biotyper.

La reidentificación de las cepas se realizó por medio de MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Ultraflex extreme, Bremen, Alemania), se prepararon previamente solvente orgánico y matriz, ácido fórmico al 70%, acetonitrilo al 100%, etanol al 100% y 70% y ácido trifluoroacético al 80% (Las instrucciones para la preparación de las soluciones se muestra en el ANEXO 13.1).

Las cepas se sembraron en agar sangre Brucella (BD Difco, Madrid, España) y se incubaron a 37°C por 18 h. Se tomó una colonia aislada y se colocó con ayuda de un palillo estéril sobre una tarjeta metálica de análisis (Bruker Daltonics Ultraflex extreme, Bremen, Alemania), se dejó secar a temperatura ambiente; sobre cada pocillo se colocó 1 µl de ácido fórmico (70%) dejando secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó 1 µl de matriz [solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA; (Bruker Daltonics Ultraflex extreme) en 50 % de acetonitrilo y 2,5 % de ácido trifluoroacético]. Los espectros que mostraron la relación masa y carga (m/z) de cada molécula ionizada, se analizaron a través del software Biotyper (Bruker Daltonics Ultraflex extreme, Bremen, Alemania) y se compararon con los espectros almacenados en la base de datos utilizando los criterios de identificación a nivel de especie, con un puntaje de entre 1.7 y 2.0 como confiables, considerando sólo la identificación a nivel de género con un puntaje menor a 1.7.

7.3 Tipificación molecular.

7.3.1 Extracción de DNA

El DNA se extrajo con el kit Quick-DNA Universal (ZYMO RESEARCH, Irvine, California, United States). A partir de un cultivo bacteriano de 18 horas, se obtuvo el paquete bacteriano y se resuspendió en 200 μ L de una solución amortiguadora isotónica con 20 μ L de Proteinasa K, se mezcló e incubó a 55°C durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionó un volumen de solución amortiguadora, se mezcló y transfirió a una columna de extracción con un tubo de colecta. La mezcla se centrifugó a >12,000 xg por un minuto, se descartó el líquido del tubo de recolección; se adicionaron a la columna 400, 700 y 200 μ L de solución de lavado, intercalando entre cada uno una centrifugación a >12,000 xg por un minuto. Finalmente, se eluyó con 50 μ L de agua, se incubó a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó a la máxima velocidad por 1 minuto. El DNA eluido se conservó a -20 °C para su posterior uso.

7.3.2 Detección de genes *bla*_{OXA}

La detección de los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-58} se realizó utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores mostrados en la Tabla 4; bajo las siguientes condiciones: desnaturalización: 94°C por 5 minutos, amplificación: 30 ciclos a 94°C durante 25 segundos, 52°C por 40 segundos, 72°C durante 50 segundos y extensión: 72°C por 6 minutos.

Para verificar la presencia del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en buffer TAE 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), durante 40 minutos en una cámara de electroforesis horizontal a 120 V (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos), posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 mg/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estado Unidos) para observar el amplificado con un transiluminador (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos).

Tabla 4. Secuencias de iniciadores para amplificar los genes *bla*_{OXA}.

GEN	Secuencias de iniciadores	Tamaño del amplificado (pb)
<i>bla</i> _{OXA-23}	F: 5'-GATCGGATTGGAGAA CAGA 3' R: 5' -ATTTCTGACCGCATTTCAT 3'	501
<i>bla</i> _{OXA-24}	F: 5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA 3' R: 5'-AGTTGACGCAAAGGGGATT3'	246
<i>bla</i> _{OXA-51}	F:5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG 3' R:5'-TGCATTGCACTTCATCTTGG-3'	353
<i>bla</i> _{OXA-58}	F: 5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3' R:5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'	599

OXA-23 (*bla*_{OXA-23}); OXA-24 (*bla*_{OXA-24}); OXA-51 (*bla*_{OXA-51}); OXA-58 (*bla*_{OXA-58}). (Hujer *et al.*, 2006).

La secuenciación del gen *bla*_{OXA-51} se realizó en una cepa de *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis* para comparar las secuencias nucleotídicas entre las diferentes especies. Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron por electroforesis capilar.

7.3.3 Perfiles de DNA plasmídico mediante la técnica de Eckhardt (1978).

La extracción del DNA plasmídico se realizó utilizando la técnica de Eckhardt (1978), descrita a continuación: las cepas se sembraron en agar sangre Brucella (BD Difco), se tomó una colonia aislada y sembró en 3 mL de LB líquido (BD Difco). Los cultivos se mantuvieron en agitación (200 rpm) a 37°C durante 15 h; posteriormente se tomaron 100 µl del cultivo anterior y se colocaron en 5 mL de caldo LB (BD Difco), el cultivo se mantuvo en agitación a 37°C durante 2.30 h. Se tomó 1 mL del cultivo anterior y se centrifugó durante 8 minutos a 14 000 rpm, se obtuvo el paquete celular y se eliminó el sobrenadante, se añadieron 500 µl de H₂O estéril fría, el paquete celular se resuspendió con agitación en vortex; posteriormente, se colocó 1 mL de solución de sarcosil al 0.3%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm durante 6 minutos, se descartó el sobrenadante y se colocaron 40 µL de ficoll (20% en TE 10:1), las muestras se dejaron en hielo durante 15 minutos; posteriormente se colocaron 20 µL de solución de lisis con lisozima [(RNAsa 0.4 mg/mL en TE + 1 mg/mL de azul de bromofenol + 80 µL de lisozima (10 mg/mL en H₂O) se mezcló cada una de las muestras sin formar burbujas. En un gel de agarosa al 0.75% con TBE 1X (Promega, Wisconsin, Estados Unidos), se colocaron 30 µL de SDS (10%), se llevó

a cabo el corrimiento electroforético a 100 Volts durante 15 minutos, utilizando TBE1X (Promega) como amortiguador de corrimiento, sin cubrir totalmente el gel y con el polo negativo invertido; transcurrido el tiempo de corrimiento, en un cuarto frío se agregó TBE 1X a la cámara hasta cubrir el gel y se colocaron 40 μ L de la muestra en cada uno de los pozos; el corrimiento electroforético se realizó durante 90 minutos a 40 V, con los polos en la orientación estándar. Posteriormente se realizó el corrimiento a 100 V durante 21 h. El gel se tiñó con 200 μ L de bromuro de etidio durante 20 minutos y destiñó con agua para su visualización.

7.3.4 Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Los aislados se sembraron en agar sangre Brucella (BD Difco) y se incubaron a 37°C por 18 h. Se tomaron de 5 a 10 colonias y se resuspendieron en 1 mL de Amortiguador de Suspensión de Gram Negativos (BSGN) (Tris-HCl 100mM, EDTA 100 Mm pH 8); se tomaron 400 μ L de la suspensión anterior, y se embebió en plugs de agarosa al 1% (SeaKem, Cambrex, Rockland, Estados Unidos), los plugs se lisaron en 5 mL de amortiguador de lisis [Tris-HCL 0.5M pH 8.0, EDTA 0.5M pH8.0, N-Lauril Sarcosil al 1% esterilizado por filtración, 25 μ L de proteinasa K (20 mg/mL)] en agitación a 200 rpm durante toda la noche a 54 \pm 2°C; posteriormente se lavaron con agua milliQ a 50°C y amortiguador TE 6X. La digestión de los plugs se realizó con la enzima *Apal* (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) y el corrimiento electroforético utilizando agarosa ultra pura (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos) y TBE 0.5X como amortiguador de corrimiento en el sistema CHEF MAPPER (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos) bajo las siguientes condiciones: tiempo inicial 5.0 s, tiempo final 30.0 s, 6V/cm, con un ángulo de inclinación de 120 y un tiempo de corrida de 24 h. El marcador Lambda (Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra, Reino Unido) se uso como referencia de talla molecular, el gel se tiñó durante 40 minutos con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio para su visualización bajo luz UV.

Los patrones de PFGE se analizaron y compararon utilizando el software NTSYS versión 2.2 (Applied Biostatistics, Setauket, New York, Estados Unidos), utilizando el algoritmo UPGMA de pares no ponderados y el coeficiente de correlación DICE.

7.3.5 MLST (Multilocus Sequence Typing)

La amplificación de los fragmentos de interés se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Diancourt y colaboradores (2010), utilizando los iniciadores propuestos (Tabla 5). Partiendo de DNA genómico (1µg) se llevó a cabo la secuenciación de estos en la plataforma Illumina Nextseq500 (2X75 pb), utilizando los siguientes adaptadores de secuenciación: F:5´- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-3´ y R:5´- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA-3´.

Tabla 5. Secuencias de iniciadores utilizados para obtener la secuencia tipo de acuerdo al esquema Pasteur.

Gen	Secuencias de iniciadores	Tamaño del amplificado (pb)
<i>cpn60</i>	F:5´- ACT GTA CTT GCT CAA GC- 3´ R:5´-GTT CAG CGA TGA TAA GAA GTG G- 3´	480
<i>fusA</i>	F:5´-ATC GGT ATT TCT GCK CAC ATY GAT- 3´ R:5´-GCC AAC ATA CKY TGW ACA CCT TTG TT- 3´	633
<i>gltA</i>	F:5´-AGA TGT ATT GGC CTC AGG TCA CTT- 3´ R:5´-GGT TTA CTT TGT AGT CAC GGT CTG-3´	545
<i>pyrG</i>	F:5´-GGT GTT GTT TCA TCA CTA GW AAA GG-3´ R:5´-GAT AAA TGG TAA AGA YTC GAT RTC ACC-3´	434
<i>recA</i>	F:5´-CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC-3´ R:5´-GGT TTC TGG GCT GCC AAA CAT TAC-3´	425
<i>rplB</i>	F:5´-GTA GAG CGT ATT GAA TAC GAT CCT AAC C-3´ R:5´- GCA CCA CCA CCR TGY GGG TGA TC-3´	472
<i>rpoB</i>	F:5´-GGC TTC TGA AGT ACG TGA CGT-3´ R:5´-TCA CGT GCA ACG TTC GCT T-3´	502

cpn60 (60-KDa chaperonina), *fusA* (factor de elongación EF-G), *gltA* (citrato sintasa), *pyrG* (CTP sintasa), *recA* (factor de recombinación homóloga), *rplB* (50S proteína ribosomal L2) y *rpoB* (RNA polimerasa subunidad B). (Diancourt *et al.*, 2010).

La secuencia obtenida de cada gen se analizó mediante el uso de la base de datos para *A. baumannii* (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). Cada cepa se caracterizó por un patrón de números que definen su ST (Secuencia Tipo).

Con base en los resultados obtenidos de PFGE se seleccionaron 5 aislados de interés para caracterizarlos con base en el protocolo Oxford (Bartual *et al.*, 2005). La amplificación de los fragmentos se realizó utilizando los iniciadores propuestos (Tabla 6). Partiendo de DNA genómico (1µg) se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las siguientes condiciones: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30

segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y un ciclo final de 72°C por 5 minutos para el caso de los genes *gltA*, *gyrB*, *recA*, *cpn60*, y *rpoD*; sin embargo, para los genes *gdhB* y *gpi* las condiciones empleadas fueron las siguientes: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C durante 2 minutos y un ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Tabla 6. Secuencias de iniciadores utilizados para obtener la secuencia tipo de acuerdo al esquema Oxford.

Gen	Secuencias de iniciadores	Tamaño del amplificado (pb)
<i>gltA</i>	F:5´- AAT TTA CAG TGG CAC ATT AGG TCC C- 3´ R: 5´GCA GAG ATA CCA GCA GAG ATA CAC G- 3´	722
<i>gyrB</i>	F:5´- TGA AGG CGG CTT ATC TGA GT- 3´ R:5´- GCT GGG TCT TTT TCC TGA CA- 3´	594
<i>gdhB</i>	F:5´-GCT ACT TTT ATG CAA CAG AGC C- 3´ R:5´-GTT GAG TTG GCG TAT GTT GTG C- 3´ F:5´- ACCA TGC TTT GTT ATG- 3´ R:5´- GTT GGC GTA TGT TGT GC- 3´	774
<i>recA</i>	F:5´- CCT GAA TCT TCY GGT AAA AC- 3´ R:5´- GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC- 3´	425
<i>cpn60</i>	F:5´- GGT GCT CAA CTT GTT CGT GA- 3´ R:5´- CAC CGA AAC CAG GAG CTT TA-3´	640
<i>gpi</i>	F:5´- GAA ATT TCC GGA GCT CAC AA- 3´ R:5´- TCA GGA GCA ATA CCC CAC TC- 3´	456
<i>rpoD</i>	F:5´- ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG-3´ R:5´- TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT-3´	672

gltA (citrato sintasa), *gyrB* (DNA girasa subunidad B), *gdhB* (Glucosa deshidrogenasa B), *recA* (factor de recombinación homóloga), *cpn60* (60-KDa chaperonina), *gpi* (Glucosa 6- fosfato isomerasa), *rpoD* (RNA polimerasa factor sigma). (Bartual *et al.*, 2005).

Para verificar la presencia de los productos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en amortiguador TAE 1X, durante 40 minutos en una cámara de electroforesis horizontal a 120 V, posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio para observar los amplificados en un transiluminador.

Los productos de PCR se purificaron y posteriormente secuenciaron mediante secuenciación Sanger por electroforesis capilar. En el caso de los genes *gdhB* y *gpi* los productos fueron ligados en el Vector de clonación pJet1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), esta mezcla de ligación se utilizó directamente

para transformar células competentes *E. coli* DH5 α , realizando después una PCR para seleccionar las colonias que contienen el plásmido con el inserto de los genes mencionados anteriormente. En aquellas bacterias que contenían el plásmido de interés se realizó la extracción de este utilizando el kit Plasmid Miniprep (Zymo, Irvine, California, Estados Unidos), para llevar a cabo su posterior secuenciación.

En la secuenciación se emplearon los iniciadores utilizados para llevar a cabo la amplificación, y los iniciadores correspondientes al vector de clonación pJET1.2/blunt (F:5´-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3´ y R:5´-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3´) según sea el caso, así como el BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing y el secuenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

7.3.6 Análisis bioinformático.

Las lecturas obtenidas para cada una de las cepas por medio de la secuenciación Illumina Nextseq500 se analizaron a través de la herramienta bioinformática FASTQC (Andrews, 2010); posteriormente, se filtraron con AfterQC (Chen *et al.*, 2017) eliminando aquellas secuencias que presentaron una profundidad menor a 20X, así como aquellas que no presentaron la longitud necesaria para llevar a cabo el análisis. Los marcadores para MLST fueron ensamblados a partir de las secuencias depositadas en PubMLST (base de datos para *A. baumannii*) empleando el programa aTRAM v2.0 (Allen *et al.*, 2018), utilizando 5 iteraciones de búsqueda tipo BLAST; así como el ensamblador Trinity v2.1. (Grabherr *et al.*, 2011) con los parámetros establecidos para lecturas pereadas. Las secuencias ensambladas fueron verificadas mediante mapeo de lecturas cruzadas utilizando “bwa”; posteriormente, las lecturas fueron filtradas con “samtools view” (-m 3), conservando sólo las lecturas que mapearan correctamente las secuencias, los mapeos fueron visualizados utilizando “Tablet” y editados manualmente usando “seaview”.

En el caso de las secuencias obtenidas por secuenciación Sanger, cada una fue analizada manualmente por medio de la visualización de los cromatogramas, utilizando los programas Chromas v2.6.6 y Bioedit v7.0.5.3; eliminando los extremos de las secuencias para mejorar la calidad de estas. Posteriormente, las secuencias se analizaron mediante el uso de la base de datos para *A. baumannii* para determinar la ST. (PubMLST: base de datos para *A. baumannii*, esquema Oxford).

7.3.7 Identificación del sistema CRISPR-CAS.

Los sistemas CRISPR-Cas IFb y AYE-Cas1 se identificaron por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C durante 7 minutos y un ciclo final de 72°C por 10 minutos. El tamaño esperado del amplificado es variable, debido a que está en función del número de espaciadores que presenta cada bacteria que amplifique el sistema (Tabla 1) (Karah *et al.*, 2015 y Hauck *et al.*, 2012)

La presencia de los amplificados se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X, durante 40 minutos en una cámara de electroforesis horizontal a 120 V, posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio para observar los amplificados con un transiluminador. Los productos de PCR se purificaron y posteriormente secuenciaron mediante secuenciación Sanger por electroforesis capilar.

Las secuencias obtenidas se compararon con la información del loci CRISPR en cepas de *A. baumannii*, la cual está disponible en el servidor CRIPSPR web server (crispr.u-psud.fr). Este servidor cuenta con 16 genomas analizados de *A. baumannii*. Las secuencias repetidas se analizaron por alineamiento múltiple utilizando el programa Multalignment y se determinó si son idénticas entre las cepas; así mismo, estas secuencias se compararon con la información del loci CRISPR en cepas de *A. baumannii*, disponible en el servidor CRISPR web server (crispr.u-psud.fr).

Tabla 7. Iniciadores para amplificación de las de espaciadores y secuencias reptidas en el sistema CRISPR-Cas.

Iniciador	Secuencia	Referencia	Tamaño del amplificado
AYE-CRIS-F	CCGTAGTTGAATCAACACGTA	Hauck <i>et al.</i> , 2012	Variable
AYE-CRIS-R	TTTGATTGGGTAAAATGCCAAA		Variable
AYE-Cas1-F	TCAAGCTGCGATGCGAATGT	Hauck <i>et al.</i> , 2012	Variable
AYE-Cas1-R	ATCCGGGCAAATTGAAACGC		Variable
Ab-CRIS-F	AGTCCCAGAGTTTTGACCCA	Karah <i>et al.</i> , 2015	Variable
Ab-CRIS-R	TTGGATTGGGTCATCATTGGT		

8.RESULTADOS

8.1. Características de los aislados del complejo Acb.

En este estudio se incluyeron un total de 66 cepas de *A. baumannii*, aisladas en el período de enero de 2015 a febrero del 2017, identificadas inicialmente con el sistema Vitek 2®. La frecuencia de aislamiento de *A. baumannii* en las áreas hospitalarias fue principalmente: Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica 24% (n=16/66), Urgencias 20% (n=13/66) y Neurocirugía 11% (n=7/66). *A. baumannii* fue aislado principalmente de muestras de sangre 47% (n=31/66), seguido de urocultivos 21% (n=14/66) y en un menor porcentaje de coprocultivos y tejidos de necropsia (Figura 3).

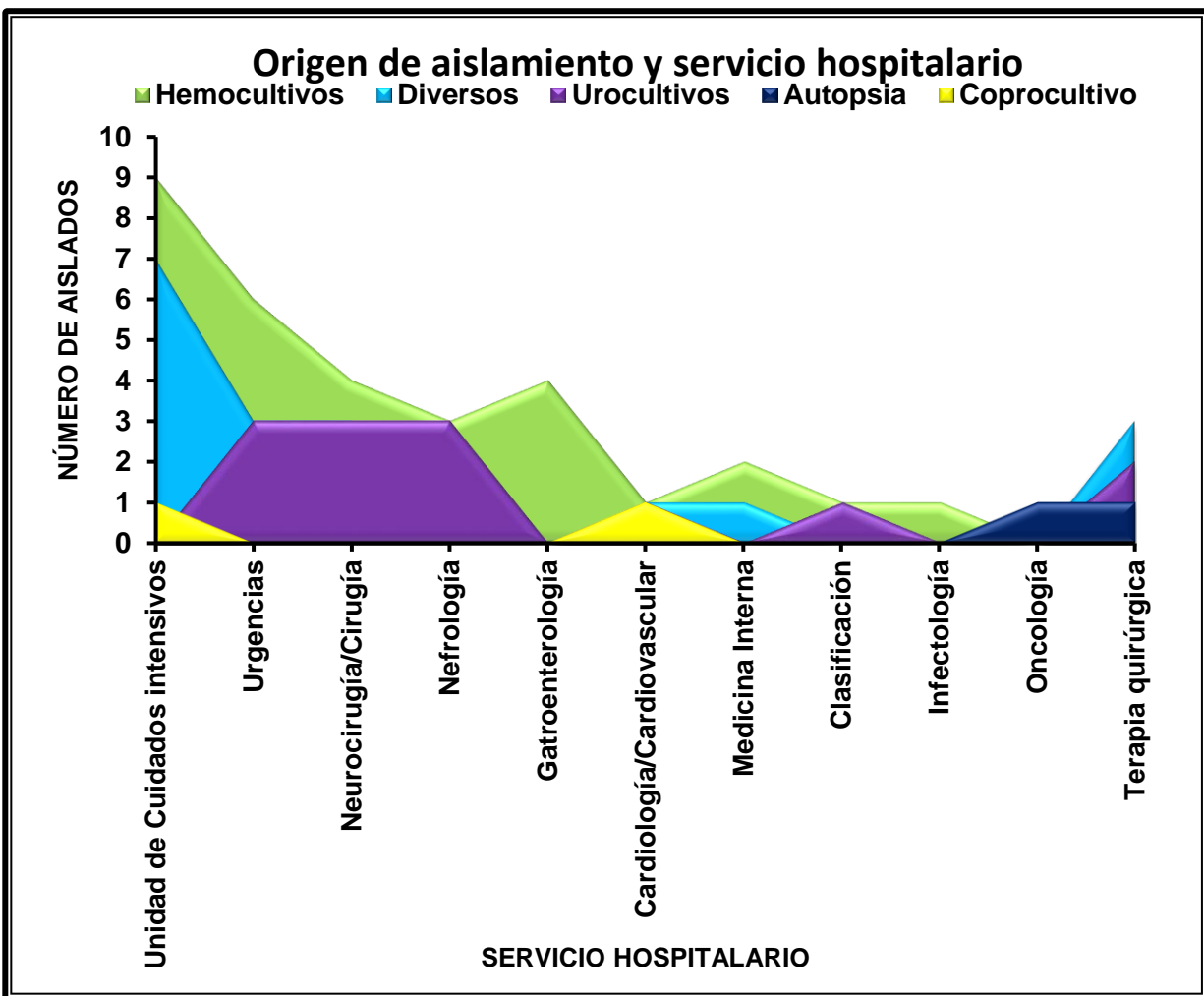


Figura 3. Frecuencia de aislamiento de las cepas identificadas como *A. baumannii* y origen de la muestra. UTIP (Unidad de Terapia Intensiva).

8.2. Identificación de aislados del complejo Acb con el equipo MALDI-TOF MS-Biotyper.

Las cepas identificadas previamente por el Vitek 2® como *A. baumannii*, fueron reidentificadas con el MALDI-TOF-MS- Biotyper, con este sistema se logró diferenciar entre las especies del complejo Acb (los espectros se muestran en el ANEXO 13.2), en donde, el 11% (n=7/66) de las cepas fueron identificadas como *A. pittii*, 4% (n=3/66) como *A. nosocomialis* y 85% (n=56/66) como *A. baumannii*.

El 100% de las cepas analizadas en este estudio fueron resistentes a ampicilina, 82% (n=54/66) a ceftriaxona, el 79% a nitrofurantoína, el 48% (n=32/66) a tetraciclina y el 100% fueron sensibles a gentamicina y tobramicina (Figura 4). De acuerdo con las definiciones propuestas por Magioraikos y colaboradores (2012), se encontró que el 50% (N=33/66) de las cepas mostraron un perfil multidrogo resistente (MDR) y el 4.5 % (n=3/66) un perfil extemo drogo resistente (XDR) (Tabla 8); presentando resistencia a los siguientes grupos de antibióticos: penicilinas (ampicilina), agentes β -lactámicos /inhibidores de β -lactamasas (ampicilina/sulbactam), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (cefepima, ceftriaxona y ceftazidima), carbapenémicos (imipenem y meropenem), aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino y moxifloxacino), folatos (trimetoprim/sulfametoxazol) y nitrofuranos (nitrofurantoína) (ANEXO 13.3). La proporción de cepas MDR a lo largo del estudio fue constante; sin embargo, las cepas XDR corresponden al año 2016. Sólo dos de las cepas MDR fueron identificadas como *A. pittii*; así mismo, las cepas identificadas como *A. nosocomialis* fueron resistentes sólo a dos de los antibióticos evaluados (piperacilina/tazobactam y ampicilina).

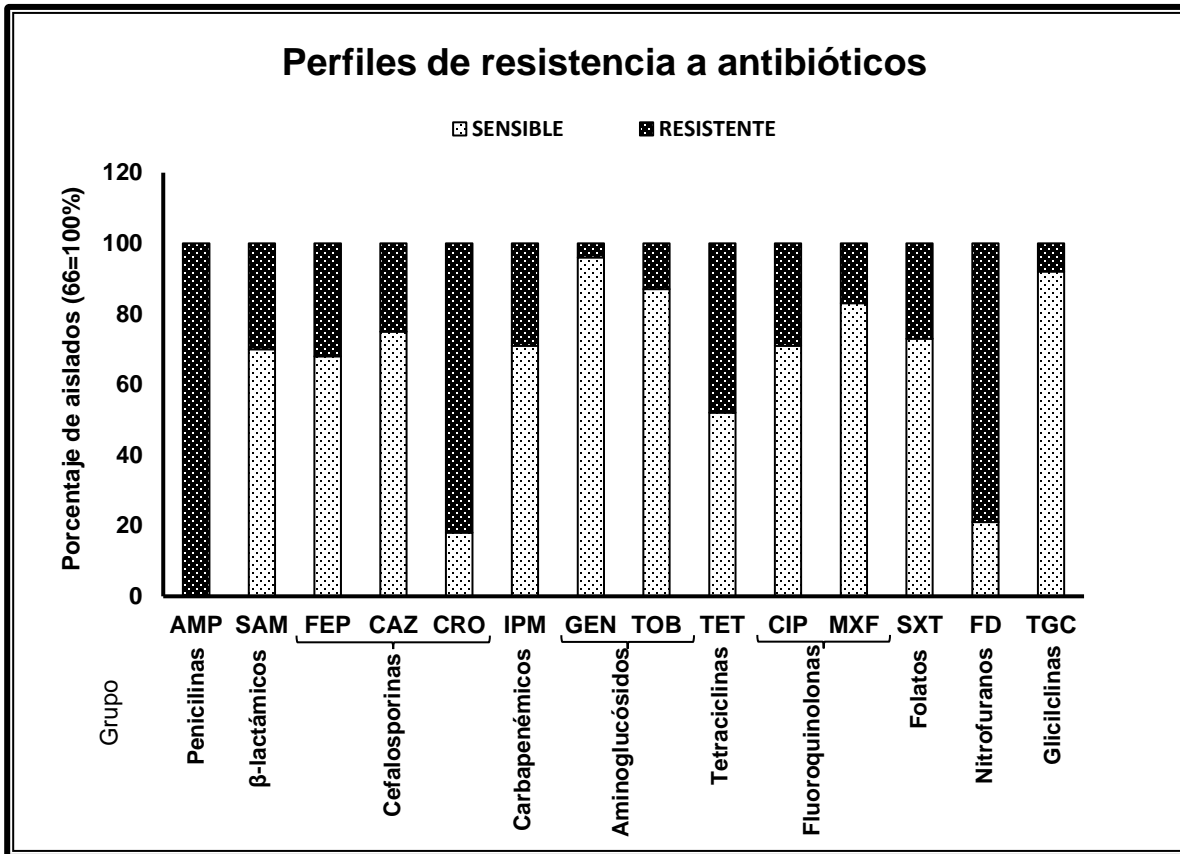


Figura 4. Porcentaje de cepas resistentes y sensibles a diferentes familias de antibióticos obtenidas a través de Vitek 2[®], la clasificación se obtuvo con base en los criterios de la CLSI (2018). AMP (Ampicilina), SAM (Ampicilina/Sulbactam), FEP (Cefepima), CAZ (Ceftazidima), CRO (Ceftriaxona), IMP (Imipenem), GEN (Gentamicina), TOB (Tobramicina), TET (Tetraciclina), CIP (Ciprofloxacino), MXF (Moxifloxacino), SXT (Trimetoprim/Sulfametoxazol), FD (Nitrofurantoína), TGC (Tigeciclina).

Tabla 8. Identificación fenotípica de las cepas clínicas a través de MALDI-TOF-MS-Biotyper y su perfil de resistencia.

No. De aislado (Año de aislamiento)	Especie determinada a través de MALDI-TOF	Perfil de resistencia	No. De aislado	Especie determinada a través de MALDI-TOF	Perfil de resistencia
49H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	901U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R
50H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	902U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R
94H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	960U (2015)	<i>A. pittii</i>	R
111U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	A-2 (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR
173H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	810CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR
180H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	471CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR
181H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	34H (2016)	<i>A. pittii</i>	R
268H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	139H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
269H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	219H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R
433H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	219H1 (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
434HR(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	330H (2016)	<i>A. nosocomialis</i>	R
434HS(2015)	<i>A. baumannii</i>	R	336H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R
470H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	361H (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR
471H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	578H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R
483H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	678D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
568H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	785H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
769H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	995H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
800H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	996H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
960H (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	136D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
37D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	203D (2016)	<i>A. baumannii</i>	R
59D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	561D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
169D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	642D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR
197D (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	714D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
209D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	728D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
319U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	740D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR
511U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	745D (2016)	<i>A. pittii</i>	R
539U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	916D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR
564U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	A-13 (2016)	<i>A. baumannii</i>	R
804U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	62D (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR
831U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	154D1 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR
837U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	154D2 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR
855U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	182H (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR
873U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	183H (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR

8.3 Detección de genes *bla*_{OXA}.

La presencia de los genes *bla*_{OXA} en las cepas analizadas se detectaron por PCR, todas las cepas amplificaron el gen *bla*_{OXA-51}, el 54% (n=36/66) *bla*_{OXA-23}, el 4.5% (n=3/66) el gen *bla*_{OXA-24} y el 1.5% (n=1/66) *bla*_{OXA-58}. En las cepas identificadas como *A. nosocomialis* y *A. pittii* se observó la presencia del gen *bla*_{OXA-51} (Figura 5). En relación con el número de genes que contenían cada cepa, se encontró que la mayoría de estas amplificaron dos genes y sólo tres cepas presentaron tres de los genes analizados (Figura 6). Interesantemente, las cepas MDR amplificaron dos genes (*bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23}) (Tabla 9).

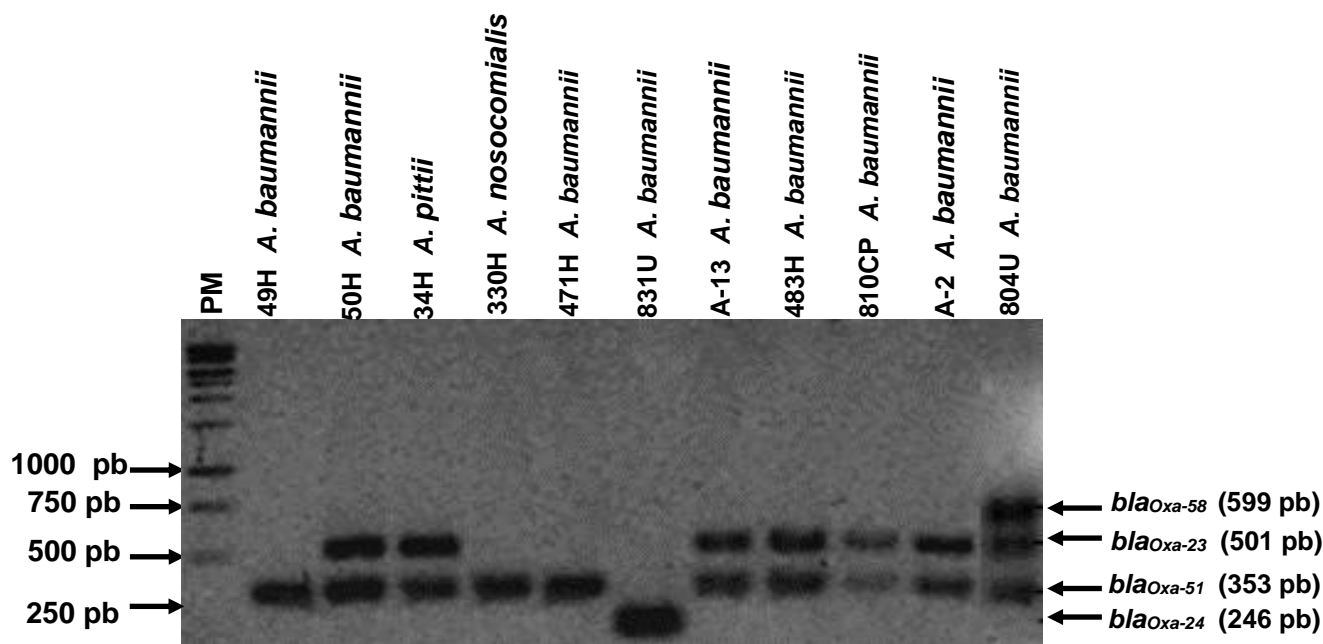


Figura 5. Gel de agarosa al 1.8% en donde se observa la amplificación de los genes *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-58}. para 11 de las cepas del complejo Acb. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States), carriles del 2 al 11: cepas del complejo Acb.

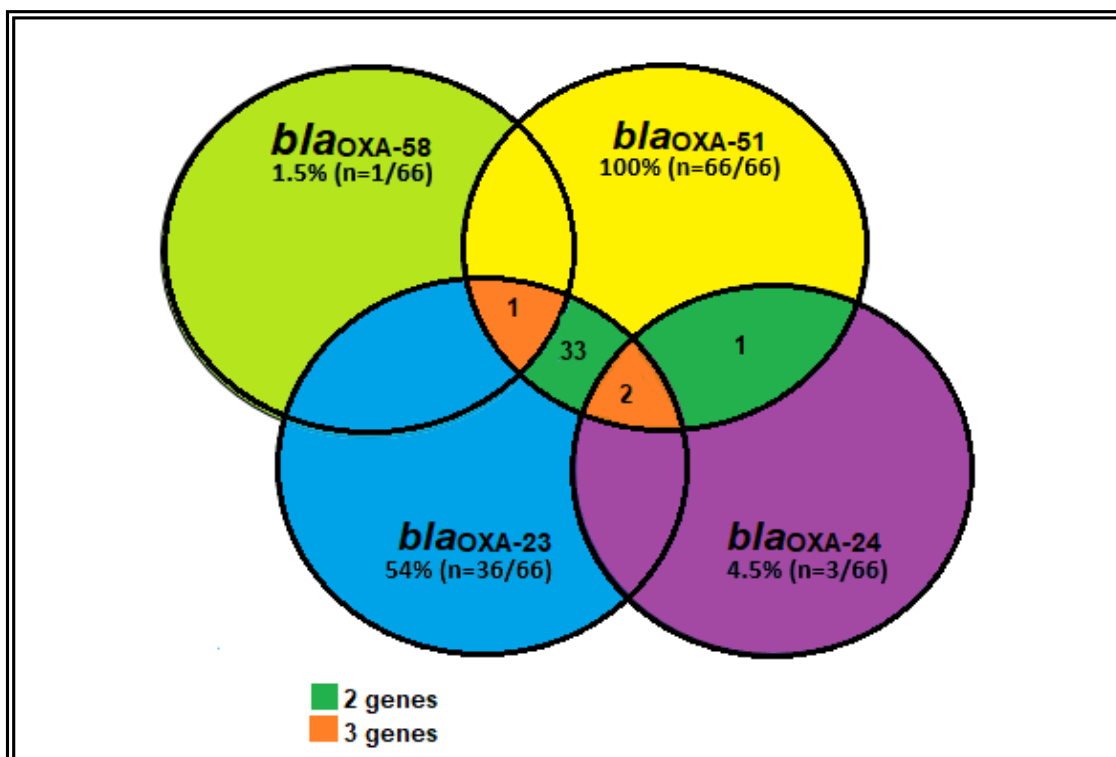


Figura 6. Diagrama de Venn en donde se observan los genes que amplificaron las cepas del complejo Acb. Se muestra el porcentaje de cepas que amplificaron cada uno de los genes y el número de cepas que amplificaron 2 y 3 genes respectivamente.

Tabla 9. Asociación de los genes *bla*_{OXA} y perfil de resistencia.

No. De aislado (Año de aislamiento)	Especie determinada a través de MALDI-TOF	<i>bla</i> _{Oxa51} (353pb)	<i>bla</i> _{Oxa58} (599pb)	<i>bla</i> _{Oxa23} (501pb)	<i>bla</i> _{Oxa24} (246pb)	Perfil de resistencia
49H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
50H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R
94H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R
173H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
180H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
181H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
268H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
269H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
433H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
434HR (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
434HS(2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
470H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R

471H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
483H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
568H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R
769H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
800H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
960H (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	MDR
37D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
59D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
169D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
197D (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	MDR
209D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
678D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
111U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
319U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
511U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
539U (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R
564U (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R
804U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	-	MDR
831U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	+	R
837U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
855U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R
873U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R
901U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
902U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	+	R
960U (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R
A-2 (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
810CP (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
471CP (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
34H (2016)	<i>A. pittii</i>	+	-	-	-	R
139H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
219H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
219H1 (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
330H (2016)	<i>A. nosocomialis</i>	+	-	-	-	R
336H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
361H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	XDR
578H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R
785H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
995H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	+	MDR
996H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
136D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
203D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R
561D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
642D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	XDR

714D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
728D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
740D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR
745D (2016)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R
916D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	XDR
A-13 (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R
62D (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	+	-	-	-	MDR
154D1 (2017)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
154D2 (2017)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR
182H (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	+	-	-	-	MDR
183H (2017)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR

El gen *bla*_{OXA-51} es considerado un gen constitutivo y exclusivo de la especie *A. baumannii*; sin embargo, en este estudio amplificó también en las especies de *A. pittii* (7) y *A. nosocomialis* (3); por lo tanto, decidimos secuenciar el producto de PCR de una cepa de cada especie. Las secuencias nucleotídicas que se obtuvieron de la secuenciación fueron de las cepas 483H *A. baumannii* y 539U *A. pittii*. En el caso de *A. nosocomialis* no se tuvo éxito en la secuenciación. La comparación de las secuencias nucleotídicas de estas cepas se realizó con la cepa de referencia *A. baumannii* AB030 (CP009257.1), observando que son idénticas a las obtenidas en este estudio (Figura 7).

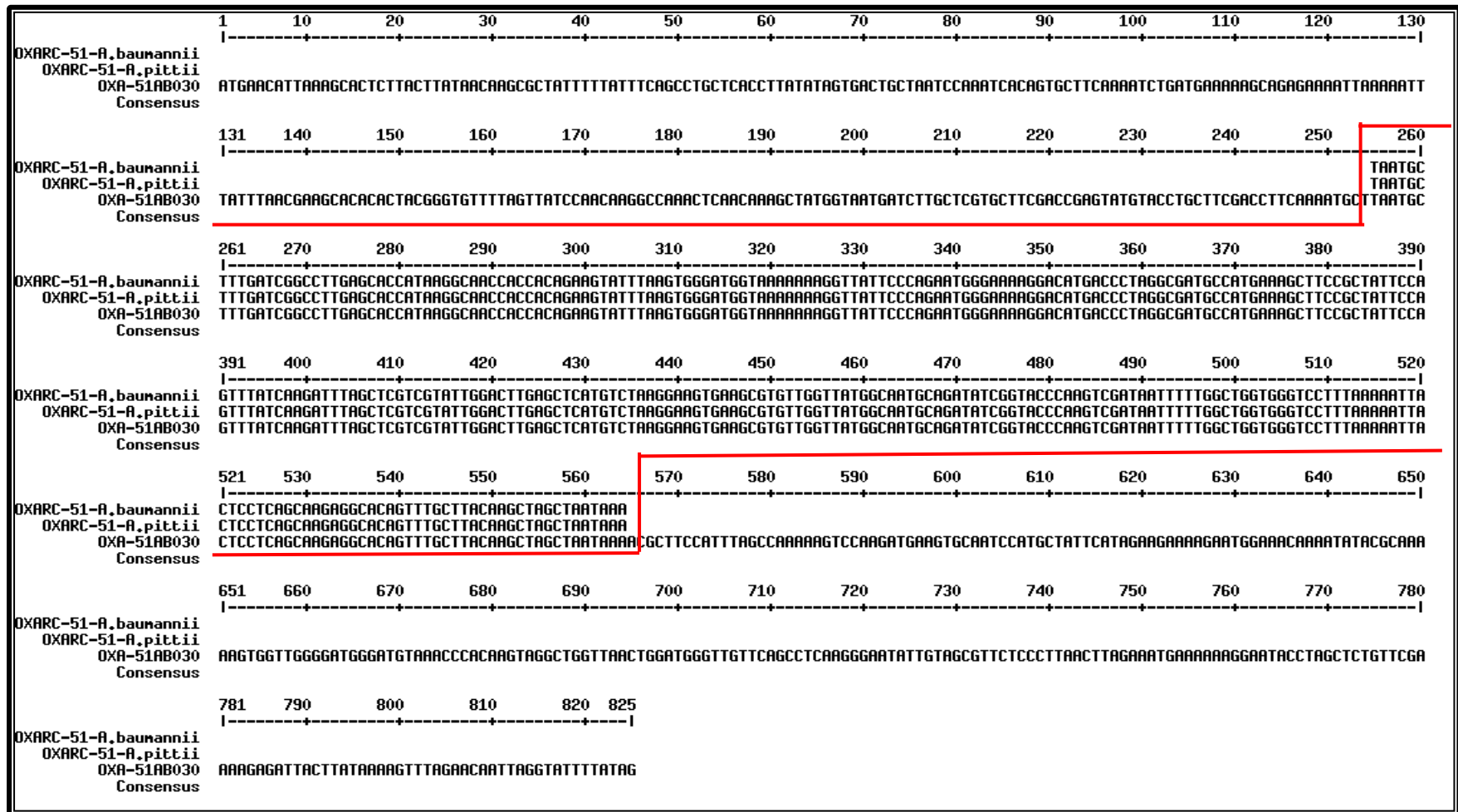


Figura 7. Alineamiento de las secuencias del gen *bla*_{OXA-51} de las cepas 483H *A. baumannii* y 539U *A. pittii*.

8.4 Perfiles de DNA plasmídico mediante la técnica de Eckhardt (1978).

Los perfiles de plásmidos obtenidos a través de la técnica de Eckardt mostraron que las cepas presentaban de 1 a 7 plásmidos con un tamaño de entre 2.4 y 121 Kb; el 31.8% (n=21/66) de las cepas presentaron 2 plásmidos, el 30.8% (n=20/66) 3 plásmidos y sólo una de las cepas presentó 7 plásmidos; el 9% (n=6/66) carecía de estos elementos móviles. En la figura 8 se muestra un ejemplo de los perfiles plasmídicos.

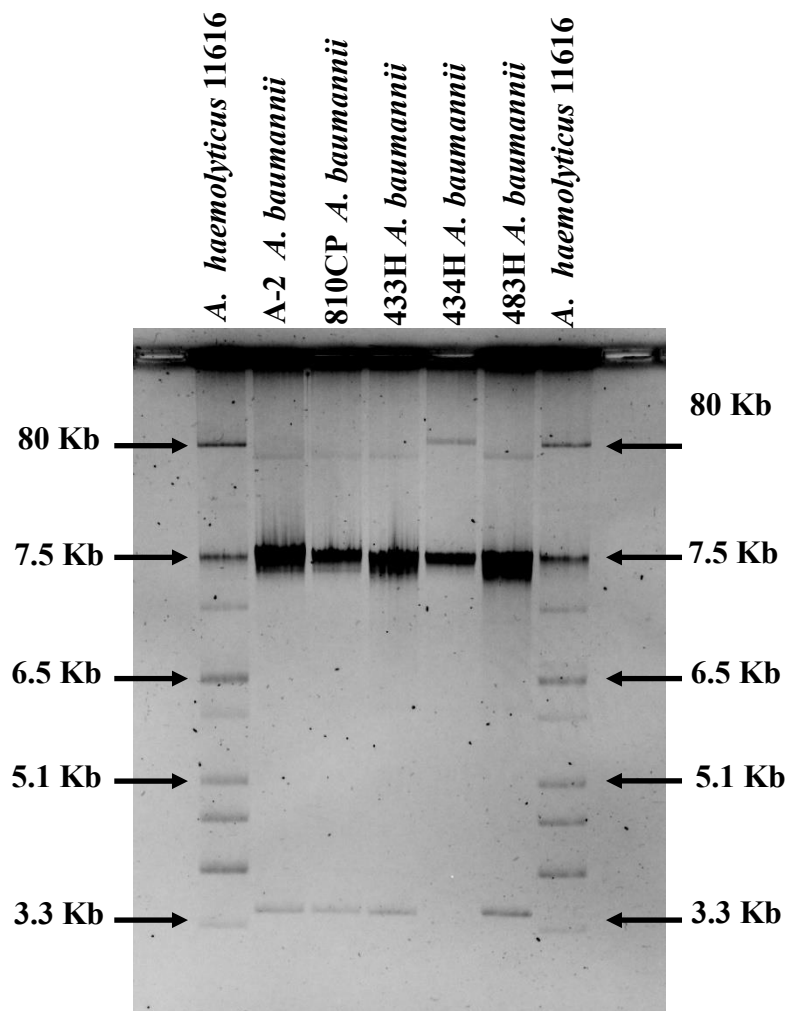


Figura 8. Gel de agarosa al 0.75% para detección de perfiles de plásmidos en cepas de *A. baumannii*. Carril 1: Marcador de peso molecular *A. haemolyticus* 11616.

Las cepas MDR presentaron 3 plásmidos (n=12/32), de ellas el 40% muestra perfiles plasmídicos idénticos, con un tamaño de entre 3.91 y 71.02 Kb; el resto de las cepas MDR presentaron hasta 7 plásmidos, no se observaron perfiles idénticos (Tabla 10).

Tabla 10. Número de plásmidos identificados en las cepas del complejo Acb.

No. De aislado (Año de aislamiento)	Especie determinada a través de MALDI-TOF	Perfil de resistencia	No. De plásmidos	Tamaño de los plásmidos
49H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	5.63 6.72
50H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	5.63 6.72
94H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	5.63 6.72
173H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	7.13 15.02 55.98
180H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7.13 15.02 55.98
181H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7.13 15.02 55.98
268H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7.13 15.02 55.98
269H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7.13 15.02 55.98
433H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	3.91 6.96 71.02
434HR (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	3.91 6.96 71.02
434HS(2015)	<i>A. baumannii</i>	R	1	8.55 2.46
470H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	5	5.18 7.44 17.14 50.01
471H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	5	2.46 5.18 7.44 17.14 50.01
483H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	3.91 6.96 71.02
568H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	1	67.84
769H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	15.029 67.55
800H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	3.54 7.39 15.90 104.06
960H (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	4	3.54 7.39

				15.90
				104.06
37D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	0	
59D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	0	
				6.9
169D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7.4
				87.8
197D (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	2	7.06
				67.84
				2.46
209D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	6.96
				12.02
				3.54
678D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	15.60
				66.29
				120.94
				3.54
				6.81
				7.39
111U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	7	24.49
				54.94
				66.29
				104.06
				2.46
319U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	6.96
				12.02
				2.73
				7.21
511U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	6	7.46
				52.73
				76.82
				113.533
539U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	6.68
				87.70
564U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	6.68
				87.70
804U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	7.00
				75.61
831U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	7.9
				77.05
837U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	0	
855U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	6.98
				77.05
873U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	6.98
				77.05
901U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	7.18
				71.31
902U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	6.9
				7.4
				87.8
960U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	1	72.51
				3.91
A-2 (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	6.96
				71.02
				3.91
810CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	6.96
				71.02
				2.64
471CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	3.54
				7.78
				17.14
				7.23
34H (2016)	<i>A. pittii</i>	R	3	43.03
				83.06

139H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	3.38 13.40 67.57
219H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	2	5.51 86.24
219H1 (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	104.45
330H (2016)	<i>A. nosocomialis</i>	R	0	
336H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	0	
361H (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	2	6.98 72.82
578H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	2	6.98 72.82 7.34
785H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	68.83 84.63
995H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	3.52 16.20
996H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	3.51 13.62 61.93
136D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	3.60 7.78 17.46
203D (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	1	17.14
561D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	6.98 72.82 3.46
642D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	4	15.63 52.73 85.60
714D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	13.62
728D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	6.98 72.82 2.64
740D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	3.54 7.78 17.14
745D (2016)	<i>A. pittii</i>	R	1	83.06
916D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	0	
A-13 (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	2	2.82 15.31
62D (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR	3	6.53 8.08 75.61
154D1 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	7.64 77.05
154D2 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	7.64 77.05
182H (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR	1	56.496
183H (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	90.01

8.5 Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis).

Los patrones de macrorestricción fueron obtenidos con la enzima de restricción *Apal*, generando entre 16 y 23 fragmentos, con un tamaño de 48 a 339 Kb (Figura 9). Acorde con los patrones de restricción las cepas se distribuyeron en ocho grupos (A-H) y se obtuvieron un total de 47 pulsotipos; dentro de los cuales se observan 15 subgrupos con un patrón de restricción idéntico y un coeficiente de correlación de 0.99. De los anteriores, nueve subgrupos reúnen aislados que fueron tomados del mismo paciente (pulsotipos 7, 8, 12, 18, 19, 24, 26, 31 y 45) y 6 de diferentes pacientes (pulsotipos 2, 11, 23, 33, 39 y 41) (Figura 10).

Es de nuestro interés resaltar que las cepas que presentaron el mismo pulsotipo, también mostraron el mismo perfil de resistencia y número de plásmidos. Los pulsotipos 23 y 41 albergan cada uno dos cepas aisladas de diferentes niños en años distintos, idénticas de acuerdo con su patrón de macrorestricción. En el caso de los pulsotipos 8 y 39 albergan dos especies diferentes de *Acinetobacter*, a pesar de presentar un patrón de macrorestricción idéntico (Tabla 11).

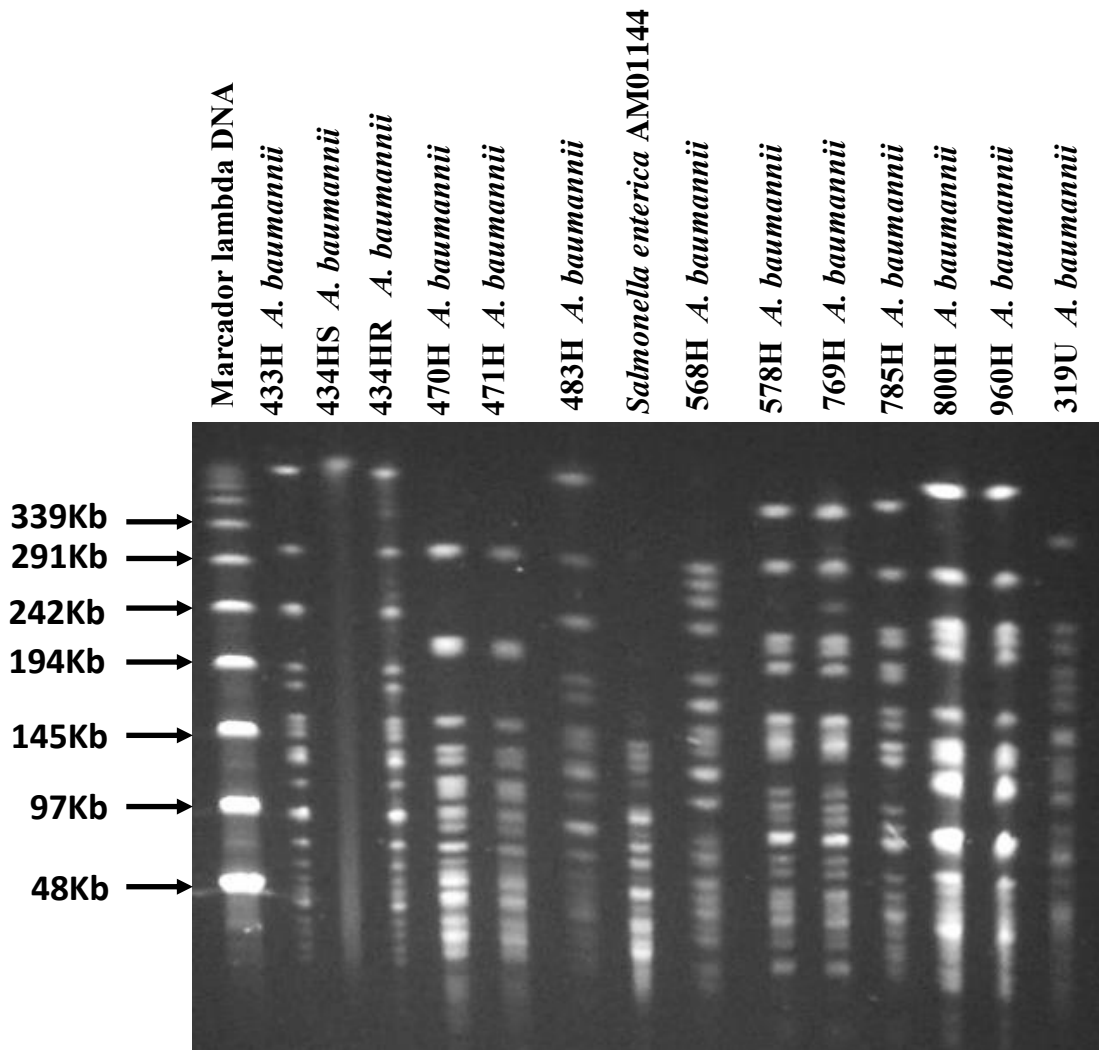


Figura 9. Esquema representativo de un gel de agarosa con corrimiento electroforético por campos pulsados (PFGE) de 11 cepas de *A. baumannii* tras restricción con *Apal*, Líneas 1-6 y 8-14. Línea M: Marcador lambda DNA con peso molecular en Kb.

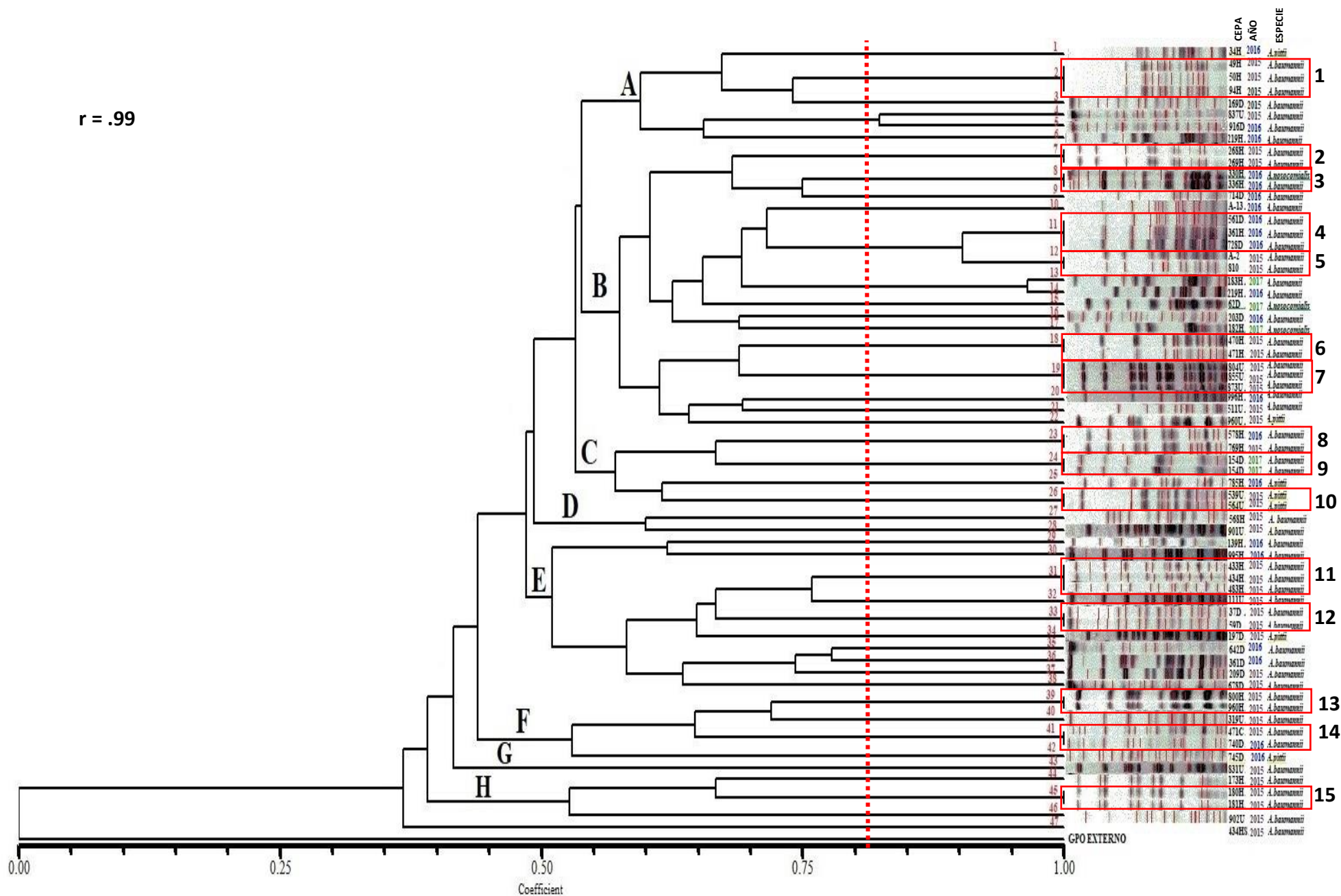


Figura 10. Dendrograma que muestra la diversidad genética de cepas del complejo Acb, determinadas por PFGE. La línea discontinua corresponde al coeficiente de correlación (80%) utilizado para definir clonas a través de PFGE. * Diferentes pacientes

Tabla 11. Pulsotipos obtenidos con la técnica de PFGE en las cepas del complejo Acb.

No. De aislado (Año de aislamiento)	Especie determinada a través de MALDI-TOF	Perfil de resistencia	No. De plásmidos	Pulsotipo
34H (2016)	<i>A. pittii</i>	R	3	1
49H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	2
50H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	2
94H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	2
169D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	3
837U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	0	4
916D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	0	5
219H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	3	6
268H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7
269H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7
330H (2016)	<i>A. nosocomialis</i>	R	0	8
336H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	0	8
714D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	9
A-13 (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	2	10
561D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	11
361H (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	2	11
728D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	11
A-2 (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	12
810CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	12
183H (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	13
219H1 (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	14
62D (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR	3	15
203D (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	1	16
182H (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR	1	17
470H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	6	18
471H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	6	18
804U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	19
855U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	19
873U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	19
996H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	20
511U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	6	21
960U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	22
578H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	2	23
769H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	23
154D1 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	24
154D2 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	24
785H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	25
539U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	26

564U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	26
568H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	1	27
901U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	28
139H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	29
995H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	30
433H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	31
434HRes (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	31
483H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	31
111U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	7	32
37D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	0	33
59D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	0	33
197D (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	2	34
642D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	4	35
136D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	36
209D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	37
678D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	38
800H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	39
960H (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	4	39
319U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	40
471CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	41
740D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	41
745D (2016)	<i>A. pittii</i>	R	2	42
831U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	43
173H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	44
180H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	45
181H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	45
902U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	46
434HSens(2015)	<i>A. baumannii</i>	R	1	47

8.6 MLST (Multilocus Sequence Typing).

A través de MLST se determinó la Secuencia Tipo (ST) de las cepas con base en el protocolo propuesto por Diancourt y colaboradores (2010), los resultados mostraron un total de 16 ST, de las cuales la más prevalente fue la ST 156 (n=18/66), seguida de las ST 132 (n=7/66), ST 1166 (n=4/66) y la ST 2 (n=4/66) (Tabla 12). Las cepas identificadas como *A. pittii*, presentaron las siguientes ST: 209, 667 y 870. Las ST más prevalentes se encontraron ampliamente distribuidas, independientemente del año, origen y pulsotipo.

En la mayoría de los grupos obtenidos por PFGE como cepas idénticas, se encontró una correlación con la ST; sin embargo, en dos casos se observaron discrepancias. El pulsotipo 23, que alberga dos cepas aisladas de niños y años diferentes, con el mismo patrón de macrorestricción presentaron ST distintas; y en el caso del pulsotipo 8, en donde se identificaron dos especies diferentes de *Acinetobacter*, se encontró la misma ST, lo que sugiere que son la misma especie.

Tabla 12. Secuencias Tipo obtenidas a través del protocolo Pasteur.

No. De aislado (Año de aislamiento)	Especie determinada a través de MALDI-TOF	Perfil de resistencia	No. De plásmidos	Pulsotipo	ST	CC
34H (2016)	<i>A. pittii</i>	R	3	1	667	214
49H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	2	462	462
50H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	2	462	462
94H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	2	462	462
169D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	3	907	629
837U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	0	4	2	2
916D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	0	5	2	2
219H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	3	6		
268H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7	1094	1094
269H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	7	1094	1094
330H (2016)	<i>A. nosocomialis</i>	R	0	8	1166	782
336H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	0	8	1166	782
714D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	9		
A-13 (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	2	10	156	79
561D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	11	156	79
361H (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	2	11	156	79
728D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	11	156	79
A-2 (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	12	156	79
810CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	12	156	79
183H (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	13	1264	1264
219H1 (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	14		
62D (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR	3	15	1166	782
203D (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	1	16	163	163
182H (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	MDR	1	17	1264	1264
470H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	6	18		
471H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	6	18		
804U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	19	132	132
855U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	19	132	132
873U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	19	132	132
996H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	20	156	79
511U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	6	21	20	20

960U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	22		
578H (2016)	<i>A. baumannii</i>	R	2	23	132	132
769H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	23	156	79
154D1 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	24	398	251
154D2 (2017)	<i>A. baumannii</i>	MDR	2	24	398	251
785H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	25	132	132
539U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	26	667	214
564U (2015)	<i>A. pittii</i>	R	2	26	667	214
568H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	1	27	132	132
901U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	2	28	744	64
139H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	1	29	156	79
995H (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	30	156	79
433H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	31	156	79
434HRes (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	31	156	79
483H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	31	156	79
111U (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	7	32		
37D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	0	33	2	2
59D (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	0	33	2	2
197D (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	2	34	209	209
642D (2016)	<i>A. baumannii</i>	XDR	4	35	156	79
136D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	36	20	20
209D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	37	156	79
678D (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	38	156	79
800H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	39	156	79
960H (2015)	<i>A. pittii</i>	MDR	4	39		
319U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	40	156	79
471CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	41	156	79
740D (2016)	<i>A. baumannii</i>	MDR	4	41	156	79
745D (2016)	<i>A. pittii</i>	R	2	42	870	870
831U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	43	132	132
173H (2015)	<i>A. baumannii</i>	MDR	3	44	338	132
180H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	45	338	132
181H (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	45	338	132
902U (2015)	<i>A. baumannii</i>	R	3	46		
434HSens(2015)	<i>A. baumannii</i>	R	1	47		

Las ST obtenidas en este estudio fueron analizadas con el algoritmo eBURST, encontrando que pertenecen a 15 complejos clonales: CC214,CC462, CC629, CC2, CC1094, CC782, CC79, CC1264, CC163, CC132, CC20, CC251, CC64, CC209 y CC870, de los cuales el complejo clonal 132 alberga dos ST (ST 132 y ST 338 (Figura 11).

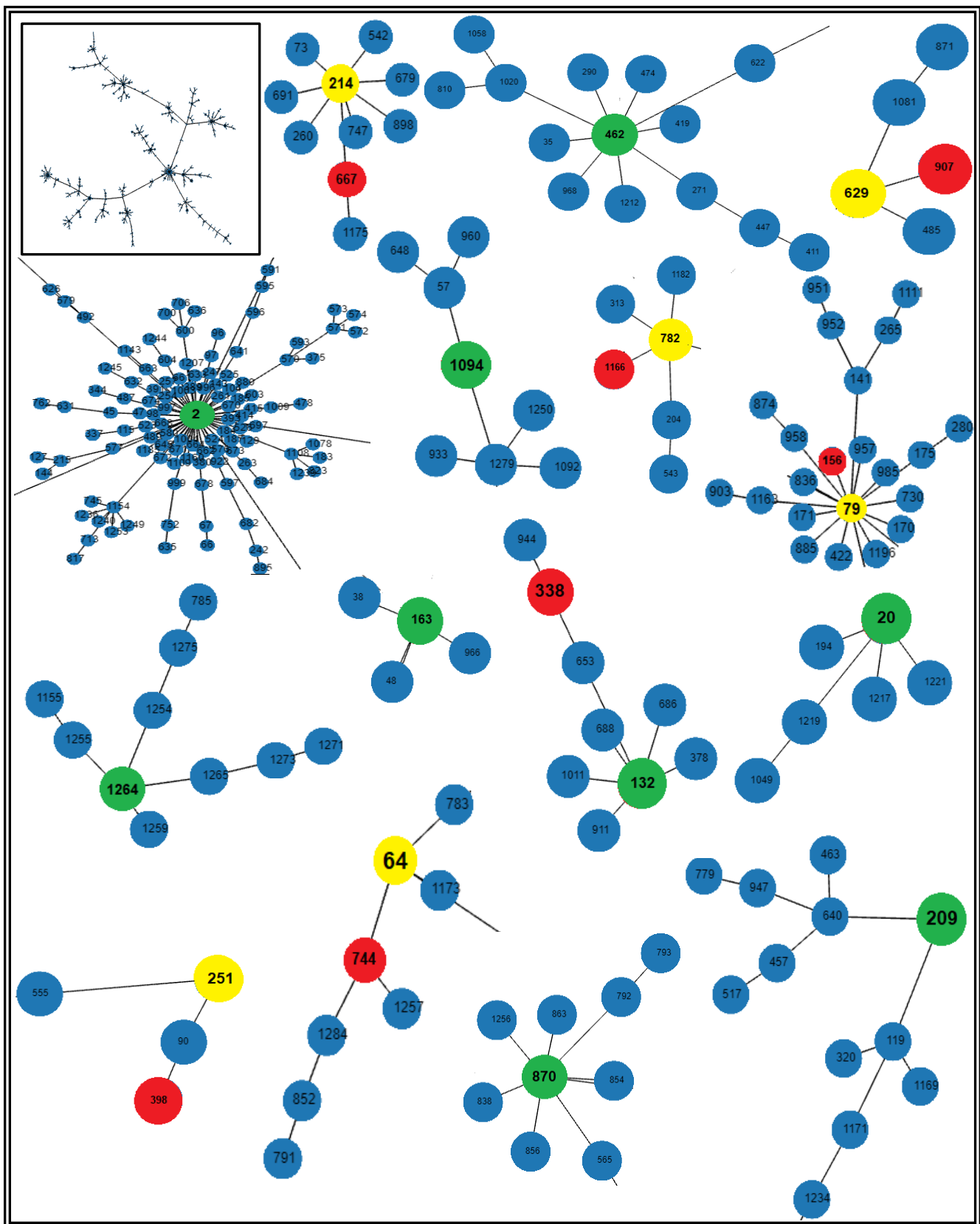


Figura 11. Análisis eBURST que muestra los grupos de ST obtenidos a través del protocolo Pasteur en las cepas del complejo Acb. En azul se muestran las ST que alberga cada CC, en rojo las ST identificadas en este estudio, en amarillo el CC (Complejo Clonal) y en verde la ST que determinan el mismo CC.

Dada la controversia que se ha suscitado con respecto a los esquemas para MLST en *A. baumannii*, se seleccionaron cinco cepas que provenían del mismo paciente con la finalidad de comparar ambos protocolos. Los resultados fueron congruentes con los obtenidos a través del protocolo Pasteur, ya que las cinco cepas presentaron la misma ST (758) (Tabla 13), la cual pertenece al complejo clonal 636 (CC636) (Figura 12).

Tabla 13. Secuencias Tipo obtenidas con el protocolo Oxford, comparados en la base de datos del MLST de *A. baumannii*.

No. De aislado	<i>cpn60</i>	<i>gdhB</i>	<i>gltA</i>	<i>gpi</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoD</i>	ST
A-2	28	8	1	106	17	10	32	758
810CP	28	8	1	106	17	10	32	758
433H	28	8	1	106	17	10	32	758
434HRes	28	8	1	106	17	10	32	758
483H	28	8	1	106	17	10	32	758

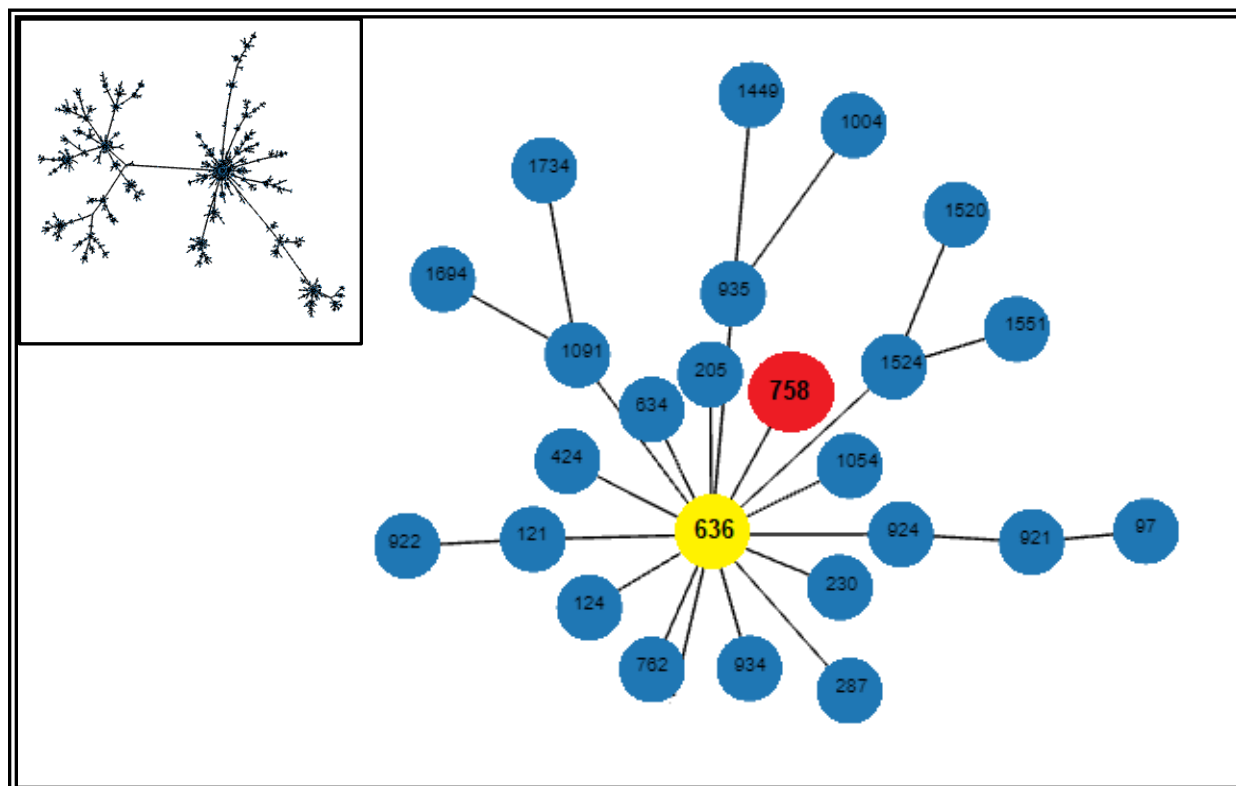


Figura 12. Análisis eBURST que muestra los grupos de ST relacionados y no vinculados con respecto a la ST758 en cepas de *A. baumannii*. En rojo se muestran la ST identificada y en amarillo el CC (Complejo Clonal) al que pertenece.

8.7 Sistema CRISPR-CAS.

Los sistemas AYECas1 y CRISPR-Cas IFb fueron identificados en las cepas de estudio. El 38% (n=25/66) de las cepas amplificó alguno de los sistemas, siendo el más prevalente con un 80% (n=20/25) el sistema CRISPR-AYECas1; mientras que el sistema CRISPR-Cas IFb sólo se identificó en el 8% (n=5/25).

Los sistemas CRISPR-Cas son identificados con base en el tamaño de los amplificadores; determinando a través de su secuenciación el número de espaciadores y secuencias repetidas; en este estudio se encontró que el tamaño del amplificado para las cepas con el sistema CRISPR-AYECas1 fue de aproximadamente 250-300 pb y para el CRISPR-Cas IFb de 700 pb (Figura 13 y 14).

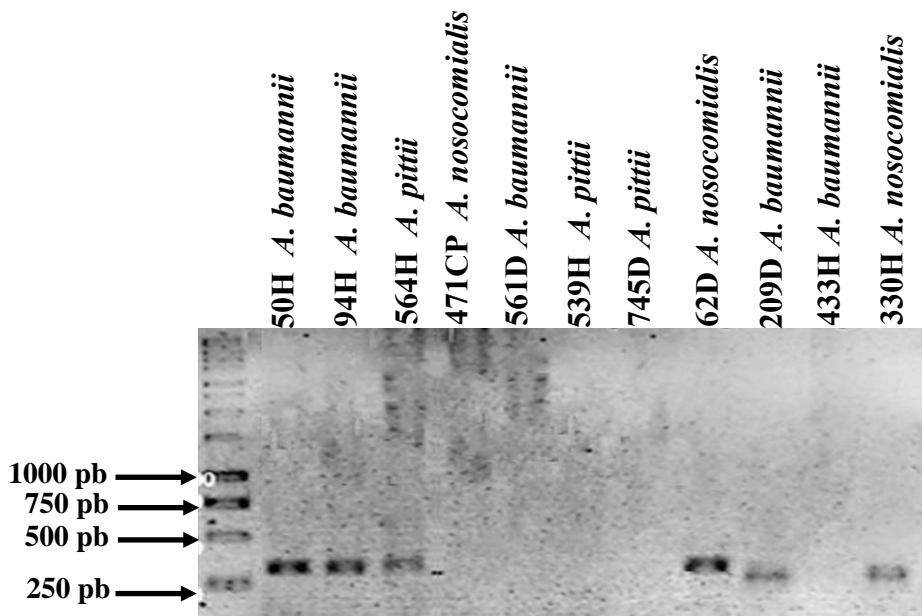


Figura 13. Gel de agarosa al 1.0% para la detección del sistema CRISPR-AYECas1 para 12 cepas del complejo Acb. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2-14 :cepas del complejo Acb.

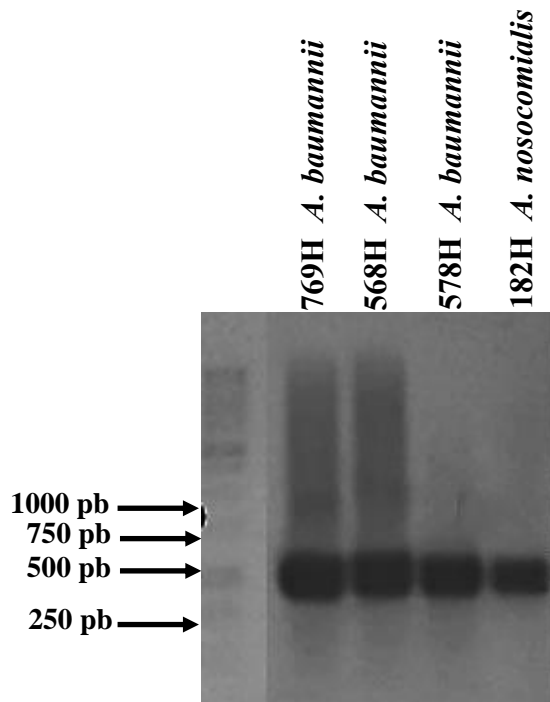


Figura 14. Gel de agarosa al 1.0% para la detección del sistema CRISPR-Cas IFb para 4 cepas de *A. baumannii*. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2-5 :cepas del complejo Acb.

Algunos de los amplificadores de ambos sistemas se secuenciaron y se determinó que para el sistema CRISPR-AYECas1 las secuencias nucleotídicas mostraron diferencias en alrededor de 15 pares de bases; en el caso del sistema CRISPR-Cas IFb las secuencias nucleotídicas mostraron un 100% de similitud (Figura 15 y 16); además, se realizó la búsqueda bioinformática en el servidor CRISPR web server en donde se encontró que para el sistema CRISPR-Cas IFb, las secuencias presentaron 10 espaciadores (Figura 17). Los espaciadores fueron comparados con la cepa de referencia *A.baumannii* AYE , los cuales mostraron un 100% de identidad (Figura 18).

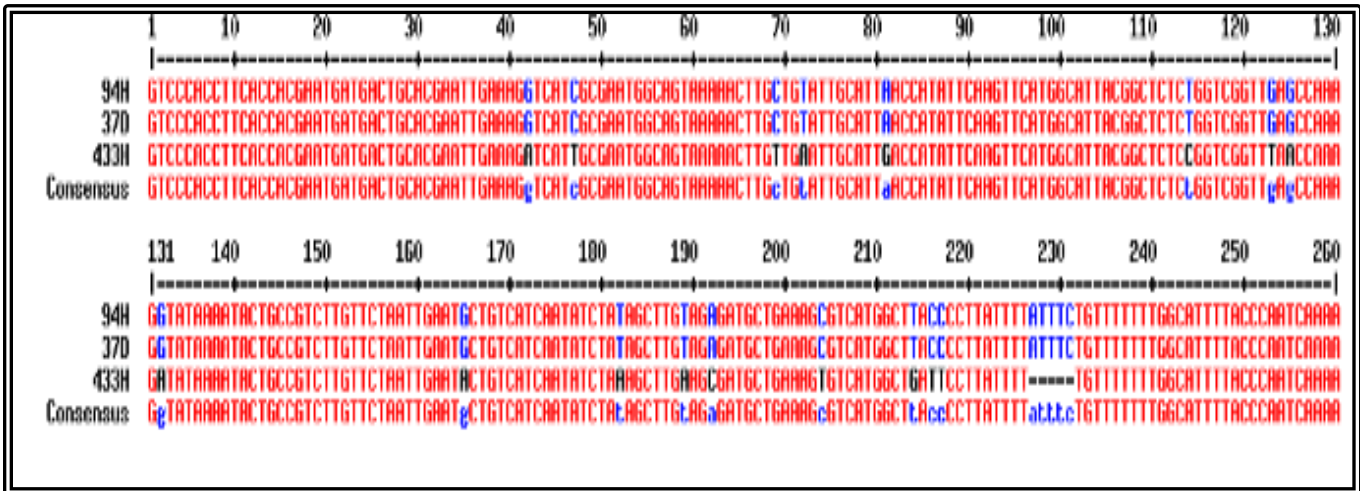


Figura 15. Alineamiento de las secuencias del sistema CRISPR-AYE Cas1 de las cepas 94H- *A. baumannii*, 37D- *A. baumannii* y 433H- *A. baumannii*.

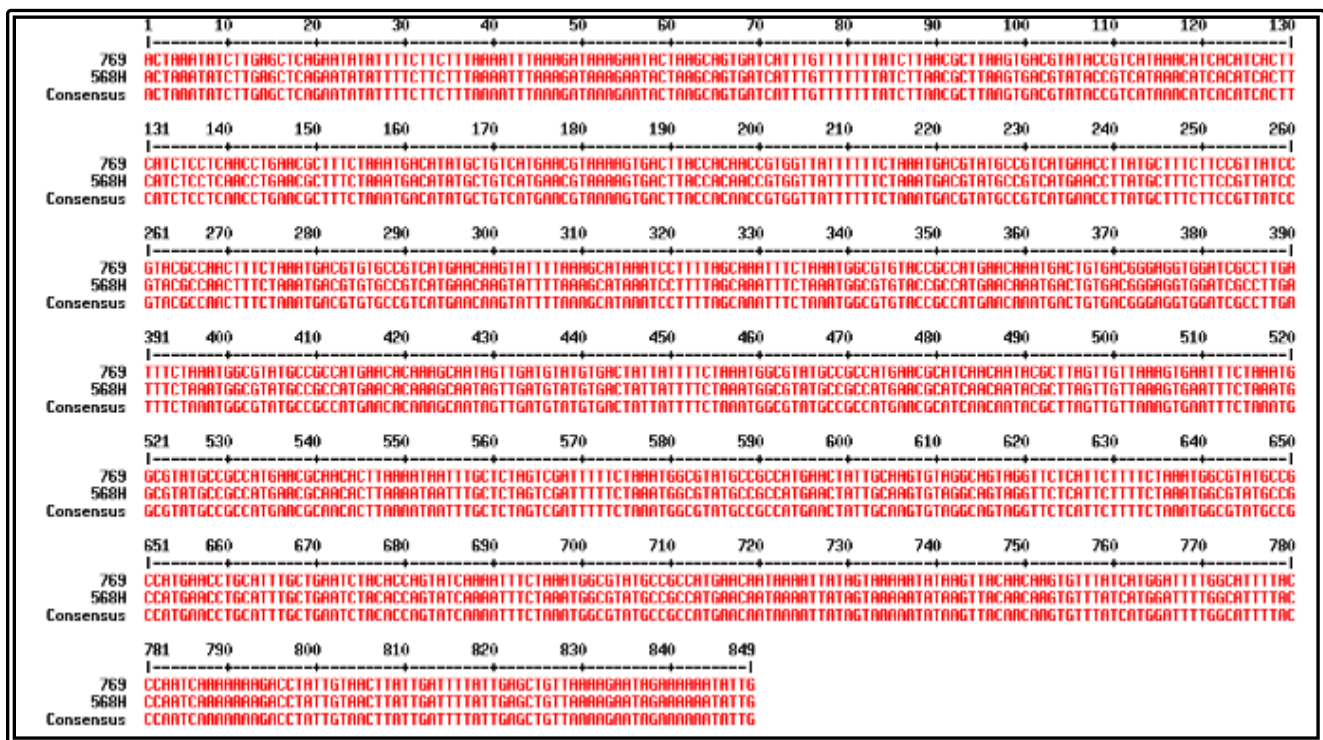


Figura 16. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del sistema CRISPR-Cas IFb de las cepas 769H *A. baumannii* y 568H *A. baumannii*.

- Genome :
- Length (bp): 854
- ID : 769H-A.baumannii

Number of obtained structures = 1	
Confirmed structures = 1	Questionable structures = 0
<ul style="list-style-type: none"> • tmp_1_Crispr_1 	

Confirmed structures (1)

CRISPR id : tmp_1_Crispr_1

- START crispr position : 86 ----- END crispr position : 713 ----- Crispr length : 627
- DR consensus : TTTCTAAATGGCGTATGCCGCCATGAAC DR length : 28
- Number of spacers : 10

86	CGCTTAAGTGACGTATACCGTCATAAAC	ATCACATCACTTCATCTCCTCAACCTGAACGC	145
146	TTTCTAAATGACATATGCTGTCATGAAC	CTEBAAGTGACTTASCACAACCGTSGTTATTT	205
206	TTTCTAAATGACGTATGCCGTCATGAAC	CTTATGCTTTTCTTCGGTTATCCGTACGCCAAC	265
266	TTTCTAAATGACGTGTGCCGTCATGAAC	EAGTATTTTAAAGCATAAATCCTTTTAGCAAA	325
326	TTTCTAAATGGCGTGTACCGCCATGAAC	AAATGACTGTGACGGGAGGTGGATCGCCTTGA	385
386	TTTCTAAATGGCGTATGCCGCCATGAAC	ACAAAGCAATAGTTGATGTATGTGACTATTAT	445
446	TTTCTAAATGGCGTATGCCGCCATGAAC	GCATCAACAATACGCTTAGTTGTTAAAGTGAA	505
506	TTTCTAAATGGCGTATGCCGCCATGAAC	GCAACACTTAAAAATAATTTGCTCTAGTCGATT	565
566	TTTCTAAATGGCGTATGCCGCCATGAAC	TATTGCAAGTGTAGGCAGTAGGTTCTCATTCT	625
626	TTTCTAAATGGCGTATGCCGCCATGAAC	CTGCATTTGCTGAATCTACACCAGTATCAAAA	685
686	TTTCTAAATGGCGTATGCCGCCATGAAC		713

Figura 17. Búsqueda bioinformática del sistema CRISPR-Cas IFb de la cepa 769H A. *baumannii*, donde se muestra el número de espaciadores identificados en este sistema.

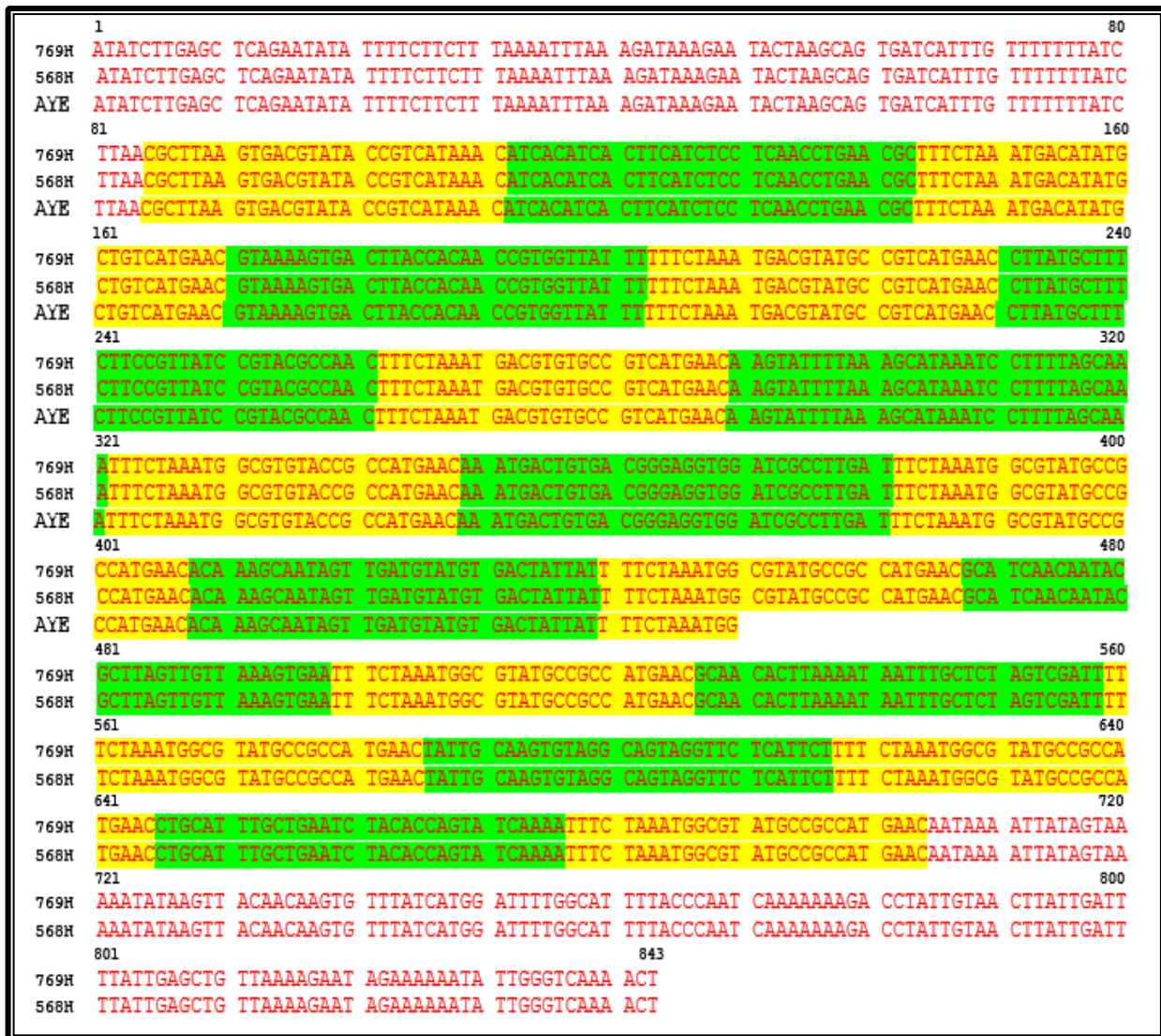


Figura 18. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del sistema CRISPR-Cas IFb de las cepas 769H *A. baumannii*, 568H *A. baumannii* y *A. baumannii* AYE. En amarillo se muestran las secuencias repetidas y en verde las secuencias de los espaciadores.

La clasificación de los sistemas CRISPR-Cas se basa en las nucleasas que se encuentran asociadas a los mismos; sin embargo, se ha sugerido que los genes *cas1* y *cas2* se encuentran conservados en todos los sistemas; en nuestro estudio se identificó el gen *cas1*, encontrando que el 32% (n=8/25) de las cepas lo amplificaron, extraordinariamente una de las cepas que amplificó este gen no presentó algún sistema CRISPR-Cas, así mismo, hubo cepas que amplificaron uno o ambos sistemas pero que no presentaron el gen *cas1* (Tabla 14).

Tabla 14. Identificación del sistema CRISPR-Cas en las cepas del complejo Acb.

No. De aislado (Año de aislamiento)	Especie	<i>blaOxa51</i> (353pb)	<i>blaOxa58</i> (599pb)	<i>blaOxa23</i> (501pb)	<i>blaOxa24</i> (246pb)	Perfil de resistencia	No. De plásmidos	Pulsotipo	ST	Sistema CRISPR- Cas	Gen Cas1
34H (2016)	<i>A. pittii</i>	+	-	-	-	R	3	1	667		
49H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	2	2	462		
50H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R	2	2	462	CRISPR-AYECas1	
94H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R	2	2	462	CRISPR-AYECas1	
169D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	3	3	907		
837U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	0	4	2		
916D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	XDR	0	5	2	CRISPR-AYECas1	
219H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	3	6		CRISPR-AYECas1, CRISPR-Cas IFb	
268H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	3	7	1094	CRISPR-AYECas1	
269H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	3	7	1094		
330H (2016)	<i>A. nosocomialis</i>	+	-	-	-	R	0	8	1166	CRISPR-AYECas1	
336H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	0	8	1166	CRISPR-AYECas1	
714D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	1	9		CRISPR-AYECas1	cas1
A-13 (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R	2	10	156		
561D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	2	11	156		
361H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	XDR	2	11	156		
728D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	2	11	156		
A-2 (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	12	156		
810CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	12	156		
183H (2017)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	1	13	1254		
219H1 (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	1	14			
62D (2017)	<i>A.nosocomialis</i>	+	-	-	-	MDR	3	15	1166	CRISPR-AYECas1	cas1
203D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	1	16	163	CRISPR-AYECas1	
182H (2017)	<i>A. nosocomialis</i>	+	-	-	-	MDR	1	17	1264	CRISPR-Cas IFb	cas1
470H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	6	18			

471H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	6	18			
804U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	-	MDR	2	19	132		
855U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R	2	19	132		
873U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R	2	19	132		cas1
996H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	20	156		
511U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	6	21	20		
960U (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R	2	22			
578H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R	2	23	132	CRISPR-Cas IFb	
769H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	23	156	CRISPR-AYECas1, CRISPR-Cas IFb	cas1
154D1 (2017)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	2	24	398		
154D2 (2017)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	2	24	398		
785H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	3	25	132		
539U (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R	2	26	667		
564U (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R	2	26	667	CRISPR-AYECas1	
568H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	R	1	27	132	CRISPR-Cas IFb	
901U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	2	28	744		
139H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	1	29	156	CRISPR-AYECas1	
995H (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	+	MDR	4	30	156		
433H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	31	156		
434HRes (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	31	156		
483H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	31	156		
111U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	7	32		CRISPR-AYECas1	
37D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	0	33	2	CRISPR-AYECas1	cas1
59D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	0	33	2	CRISPR-AYECas1	
197D (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	MDR	2	34	209		
642D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	XDR	4	35	156	CRISPR-AYECas1	cas1
136D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	4	36	20		
209D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	3	37	156	CRISPR-AYECas1	cas1
678D (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	4	38	156		

800H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	4	39	156	
960H (2015)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	MDR	4	39		
319U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	3	40	156	CRISPR-AYECas1
471CP(2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	4	41	156	
740D (2016)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	-	MDR	4	41	156	
745D (2016)	<i>A. pittii</i>	+	-	+	-	R	2	42	870	
831U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	+	R	3	43	132	
173H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	MDR	3	44	338	CRISPR-AYECas1
180H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	3	45	338	CRISPR-AYECas1
181H (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	3	45	338	CRISPR-AYECas1
902U (2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	+	+	R	3	46		
434HSens(2015)	<i>A. baumannii</i>	+	-	-	-	R	1	47		

Los resultados obtenidos con la identificación del sistema CRISPR-Cas mostraron una correlación entre el sistema, perfil de plásmidos, pulsotipo y ST; sin embargo, existe un caso donde dos cepas que presentaron el mismo pulsotipo (23) y que provienen de niños y años distintos, poseían diferentes sistemas CRISPR-Cas, perfil de plásmidos, ST y perfil de resistencia, sugiriendo que se tratan de cepas distintas a pesar de tener el mismo perfil de macrorestricción. En el caso de las cepas MDR no se encontró una asociación entre el sistema CRISPR-Cas y este perfil de resistencia.

9. DISCUSIÓN

Las IAAS representan un serio problema de salud pública, debido a las altas tasas de mortalidad con las que se les relaciona (WHO, 2003). En el caso de hospitales pediátricos, este tipo de infecciones se reportan con mayor frecuencia en la unidad de cuidados intensivos, donde uno de los principales agentes etiológicos es *A. baumannii* (Camacho *et al.*, 2004). De acuerdo con la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), en el año 2015 *A. baumannii* se encontró entre los primeros 5 patógenos implicados en el desarrollo de IAAS; existen diferentes características de esta bacteria que le han permitido emerger como un microorganismo nosocomial, entre las que se encuentran la resistencia a antibióticos, así como su capacidad de persistir en los entornos hospitalarios por su capacidad de resistencia a la desecación (Harding *et al.*, 2017).

En este estudio, se trabajó con un total de 66 aislados, los cuales provienen de diferentes muestras y servicios hospitalarios; en donde el servicio con mayor recurrencia de *A. baumannii* fue la UTIP, lo que coincide con lo observado en otros países como Marruecos, donde se aísla con mayor frecuencia en la UCI (Uwingabiye *et al.*, 2017), lo mismo se ha encontrado en lugares como Europa, Asia, Estados Unidos y América Latina (Vincent *et al.*, 2009; Sader *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2009); por lo que es importante contar con métodos que permitan identificar oportunamente estos microorganismos en estas salas. La alta recurrencia en el aislamiento de *A. baumannii* en la Unidad de Cuidados Intensivos se atribuye a factores de riesgo para el desarrollo de infecciones causadas por los miembros del complejo Acb, entre los que destacan procedimientos invasivos, ya sea colocación de catéteres o bien intubación endotraqueal (Lynch *et al.*, 2017), así como las infecciones del tracto urinario e infecciones de tracto respiratorio (Maragakis y Perl, 2008; Cisneros, 1996); sin embargo, el desarrollo de las infecciones por *A. baumannii* también está relacionado con la condición inmune del paciente, pues se ha observado que individuos con enfermedades graves como neoplasias malignas hematológicas (Turkoglu *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2016), Diabetes mellitus e incluso sometidos a terapia antimicrobiana prolongada con antibióticos de amplio espectro (Vincent *et al.*, 2009; Kempf *et al.*, 2012) son más susceptibles a desarrollar estas infecciones.

Dentro del género *Acinetobacter* existen 6 especies que presentan un fenotipo muy similar, por lo que se han agrupado en un complejo denominado Acb o *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. De las especies del complejo, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. baumannii*, son las de mayor importancia nosocomial, siendo esta última la que se encuentra asociada a un mayor número de infecciones y mortalidad, además del fenotipo de resistencia a diferentes antibióticos que presenta; no obstante, se ha incrementado la frecuencia de aislamiento de *A. pittii* y *A. nosocomialis* como agentes causantes de IAAS (Wisplinghoff *et al.*, 2012). De acuerdo con Yang y colaboradores (2012), las tasas de mortalidad de *A. pittii* son mayores a *A. nosocomialis*, pero menores que *A. baumannii*; lo que nos sugiere que en un futuro *A. pittii* podría emerger también como un importante patógeno nosocomial. Por esta razón, la tipificación molecular del complejo Acb a través de diferentes técnicas es primordial para generar información acerca de la epidemiología de este complejo y así conocer más acerca de la distribución de estas bacterias en los ambientes hospitalarios.

Considerando los puntos anteriores y dado que el empleo de pruebas bioquímicas ha dificultado la diferenciación de las especies del complejo Acb, en este trabajo se realizó la reidentificación de las cepas de estudio, a través de espectrometría de masas MALDI-TOF MS. Las cepas fueron inicialmente identificadas como *A. baumannii* a través del sistema automatizado VITEK 2®, basándose en el uso de tarjetas con paneles de reacciones bioquímicas para el reconocimiento de la bacteria (Vargas *et al.*, 2005). Sin embargo, con base en los resultados obtenidos a través de MALDI-TOF MS encontramos que siete de las 66 cepas fueron identificadas como *A. pittii* y tres como *A. nosocomialis*, el resto como *A. baumannii*. Determinamos que esta técnica permite la diferenciación entre las especies que pertenecen al complejo Acb. Esta técnica se basa en la ionización de proteínas (proteínas ribosomales) a través de la generación de un espectro, su comparación con una base de datos permite identificar al microorganismo, ya sea a nivel de género o especie (Fagerquist *et al.*, 2010). Los criterios para identificar los aislados a nivel de género y especie, indican que si se tiene un valor <1.7 la identificación sólo es a nivel de género y >1.7 se puede asegurar que la identificación es a nivel de especie. En este estudio, la puntuación obtenida para cada una de las cepas fue mayor a 1.7, por lo que se puede asegurar que la identificación es a nivel de especie. Cada miembro del complejo Acb presenta una serie de picos únicos, los cuales son la base para la diferenciación entre estas; en el caso de *A. pittii* hay dos picos que permiten su identificación (5777 m/z y 6692 m/z), en *A. baumannii* un pico (5747 m/z) y en *A. nosocomialis* tres picos únicos (4069 m/z, 7893

m/z y 8135 m/z) (Hsueh, 2014; Almirall *et al.*, 2017); sin embargo, existen estudios que indican que la diferenciación del complejo Acb puede dificultarse, principalmente entre *A. baumannii* y *A. nosocomialis* pues la asignación taxonómica de los espectros es incorrecta en las bases de datos de Bruker (Espinal *et al.*, 2012; Kishii *et al.*, 2014); esta podría ser una de las explicaciones al hecho de que un bajo porcentaje de otras especies del complejo Acb, diferentes a *A. baumannii* sean identificadas por este método. Si bien lo anterior nos habla de la similitud que existe entre especies; por otro lado, debe trabajarse aún más en la actualización y mejora de las bases de datos con las que se compara. Con base en lo anterior, podemos decir que el MALDI-TOF MS es una técnica sencilla, rápida y reproducible para llevar a cabo la identificación del complejo Acb; aunque en cuanto a la diferenciación de las especies del complejo, aún existen discrepancias; además, debido al costo del equipo y del material para su uso, el acceso al mismo aún es limitado.

En otro aspecto, en *A. baumannii* el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos es la degradación enzimática por betalactamasas; las Oxas (oxacilinasas) le confieren la capacidad de hidrolizar oxacilina. En este trabajo se identificaron por PCR el gen *bla*_{OXA-51}; además de los genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24} y *bla*_{OXA-58}, ya que son los que se han identificado más frecuentemente en cepas de *A. baumannii* (Evans y Amyes, 2014). El 100% de las cepas presentaron la *bla*_{OXA-51}, misma que se ha reportado como intrínseca en *A. baumannii*, junto con la *bla*_{OXA-69} (Brown *et al.*, 2005); por lo tanto, es de localización cromosómica y la detección de esta permite su identificación a nivel de especie; tal como lo demostraron Turton y *et al.*, (2006). Si bien, una de las primeras técnicas que se emplea en la identificación de *A. baumannii* es la amplificación del gen *bla*_{OXA51}, este podría utilizarse también en la identificación de otras cepas del complejo Acb, las cuales también tienen relevancia nosocomial. En nuestra investigación se realizó además la secuenciación del amplificado de este gen para el caso de las tres especies del complejo Acb que se identificaron, se seleccionó una cepa al azar de cada especie con la finalidad de determinar si había diferencias entre las secuencias nucleotídicas; extraordinariamente las secuencias son iguales y al compararlas con una secuencia de referencia (*A. baumannii* cepa AB030) no se encontraron diferencias. Otro aspecto importante de destacar es que el gen *bla*_{OXA-51} es un mecanismo de resistencia intrínseco que hidroliza débilmente penicilinas; sin embargo, se ha encontrado que elementos de inserción como ISAba1 río arriba de este gen pueden asociarse con resistencia a carbapenémicos como imipenem y meropenem (Turton *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2004; Martínez, 2012).

En cuanto a los genes *bla*_{OXA} que se identificaron, el 50% de los aislados presentaron el gen *bla*_{OXA-23}; este fue el primer grupo identificado en *A. baumannii*, la producción de esta enzima (OXA-23) es considerada como suficiente para conferir resistencia a carbapenémicos. De todos los grupos de OXA's este es el que se encuentra mayormente distribuido, se ha detectado en aislados clínicos en Brasil, Bélgica, Singapur y Francia, donde estos aislados se han relacionado a brotes. Además, se ha demostrado que la presencia de dicho gen no sólo se limita a aislados clínicos, sino también ambientales, sugiriendo que la propagación de estos genes ocurre en diferentes ambientes y bajo presiones selectivas distintas (Girlich *et al.*, 2010). La presencia de este gen está relacionada con resistencia a imipenem (Evans *et al.*, 2014); en este estudio el 27% de las cepas que lo amplificaron presentaron resistencia a imipenem. Otro aspecto importante que encontramos es que el 86% de las cepas identificadas como *A. pittii* amplificaron el gen *bla*_{OXA-23}; de lo cual hay pocos reportes en América Latina y en México, debido a que esta especie se asocia con otros determinantes de resistencia como el gen *bla*_{OXA-58} y metalo-β-lactamasas (*bla*_{NDM-1}) (Yang *et al.*, 2012).

El gen *bla*_{OXA24}, se detectó en el 4.5 % de las cepas; este grupo ha sido denominado actualmente como *bla*_{OXA24/40}, se han descrito alrededor de seis variantes para esta enzima (Evans *et al.*, 2014), las cuales participan en la hidrólisis de penicilinas, presentando una actividad débil contra cefalosporinas y carbapenémicos. Este tipo de oxacilinasas no presenta actividad hidrolítica contra oxacilina, cloxacilina y meticilina, como sucede en todas las oxacilinasas; pero sí presenta actividad hidrolítica para imipenem y meropenem (Bou *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que la presencia de esta enzima no sólo proporciona resistencia a los antibióticos ya mencionados, sino que también presenta actividad contra cefalosporinas y aztreonam, esto debido a diversas mutaciones que le brindan la capacidad de ampliar la actividad hidrolítica para otros betalactámicos (Kooti *et al.*, 2015). En este estudio se encontró que el 38% de las cepas mostraron un perfil MDR, definido por la resistencia a penicilinas, agentes β-lactámicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, folatos y nitrofuranos. Sin embargo, para el caso de cefalosporinas y nitrofuranos los porcentajes de resistencia fueron los más altos, especialmente en este último donde el 79% de las cepas fueron resistentes.

A pesar de que la presencia de genes *bla*_{OXA} está relacionada con la resistencia a carbapenémicos, el porcentaje de cepas que amplificaron estos genes y que presentaron

resistencia a imipenem fue bajo; sin embargo, algo interesante que se ha observado en cepas de *A.baumannii*, es la heteroresistencia a carbapenémicos, es decir, la presencia de subpoblaciones de bacterias resistentes que crecen lentamente a diferencia de las subpoblaciones susceptibles (Ikonomidis *et al.*, 2009; Pournaras *et al.*, 2005), en nuestro trabajo encontramos que en un paciente se aislaron dos cepas que presentaron el mismo perfil de macrorestricción, perfil de plásmidos y ST; sin embargo, sólo una de las dos presentó resistencia a imipenem, lo anterior sugiere que un mismo paciente puede albergar subpoblaciones susceptibles y resistentes, las cuales dependiendo de las presiones selectivas pueden ser favorecidas; es importante considerar lo anterior, en el tratamiento de los pacientes con alguna infección asociada a *A. baumannii* e incluso a otras especies del complejo Acb, es primordial conocer la susceptibilidad a estos antibióticos con la finalidad de realizar un tratamiento certero y así contrarrestar las altas tasas de mortalidad y altos costos producidos por las estadías prolongadas en hospitales debido a las infecciones provocadas por miembros del complejo Acb (Lee *et al.*, 2014; Ko *et al.* 2007).

La mayoría de los elementos que codifican para la resistencia se pueden encontrar en elementos móviles, como los plásmidos. La determinación de perfiles plasmídicos se ha utilizado para la comparación de cepas con base en el número de plásmidos, pues estos se pueden encontrar en número idéntico, tamaño y peso molecular en bacterias con diferentes orígenes de aislamiento (Betancor *et al.*, 2008); al implementar esta técnica para la caracterización de nuestras cepas encontramos que presentaron hasta siete plásmidos. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Shin *et al* (1994), quienes realizaron la caracterización de 132 cepas clínicas de *A. baumannii* a través de la presencia de plásmidos, determinando que estos presentaron de 1 a 7 plásmidos, además de que los aislados provenientes de pacientes de la UCI presentaron perfiles de plásmidos idénticos; en nuestro caso, las cepas aisladas en la UCI no presentaron el mismo perfil, pero sí en su mayoría presentan 3 y 4 plásmidos; lo contrario ocurrió en el caso de las cepas identificadas como *A. pittii* donde el 71% de las mismas presentaron dos plásmidos, los cuales tuvieron también el mismo tamaño. El número de plásmidos en todas las cepas de estudio fue diverso y no hay un patrón que se encuentre en las diferentes especies. Si bien el perfil de plásmidos es una técnica fácil de realizar, hay que recordar que los plásmidos son elementos móviles y transferibles, por lo que sería probable que los perfiles cambiaran en un período de infección o en un episodio epidémico. Además, la interpretación de los perfiles puede llegar a ser complicada, pues dependiendo del método de lisis empleado se

pueden obtener diferentes formas del mismo plásmido, siendo difícil diferenciarlas; por lo que, se ha recomendado el uso de endonucleasas. Sin embargo, hay otros autores que sugieren también el empleo de otras técnicas de tipificación, como PFGE o ribotipificación para corroborar los resultados obtenidos a través del perfil de plásmidos (García *et al.*, 1996). Con lo mencionado hasta ahora podemos concluir que, con respecto al perfil de plásmidos, esta es una técnica sencilla, fácil y rápida de realizar; así mismo, aunque encontramos que no hay un perfil plasmídico que caracterice a las especies del complejo Acb, sí pudimos tipificar las cepas con base en el número de plásmidos, además estos datos coinciden con otras técnicas implementadas en nuestra investigación.

Una de las herramientas más empleadas en la tipificación de cepas clínicas es el PFGE, debido a su alta reproducibilidad (Seifert *et al.*, 2005), las cepas de estudios fueron caracterizadas con base en los patrones de restricción obtenidos a través de esta herramienta. El dendrograma que se generó de los patrones de macrorestricción agrupó las cepas de acuerdo con la similitud de los patrones. De acuerdo con Tenover (1995) cuando los aislados no difieren en el patrón de bandas, entonces se consideran indistinguibles y, por lo tanto, las cepas pueden asociarse. Encontramos que 15 subgrupos presentaron un patrón de restricción idéntico, de los anteriores, 9 reúnen aislados que fueron tomados del mismo paciente y 6 de diferentes, estos últimos además provienen de servicios hospitalarios distintos; sin embargo, a pesar de presentar el mismo patrón de restricción deben considerarse otros análisis que permitan determinar si genéticamente se trata de la misma cepa y entonces podrían ser consideradas como clonas.

Las cepas identificadas como *A. pittii* y *A. nosocomialis* no presentaron un patrón de restricción exclusivo de sus especies; sin embargo, algo interesante de mencionar es que se encontró un caso en el que en un paciente se aislaron dos especies diferentes, identificadas como *A. baumannii* y *A. nosocomialis*, mismas que presentaron el mismo pulsotipo (8) y además el mismo origen de aislamiento, con esto podríamos sugerir que podría haber más de dos especies pertenecientes al complejo Acb causando una infección en el mismo paciente. Lo anterior es de importancia clínica, se ha demostrado que hay diferencias en las infecciones causadas por estos microorganismos, como en el caso de la neumonía nosocomial, que se sabe que la provocada por *A. baumannii* tiende a ser más grave que la producida por *A. nosocomialis*; en este caso el paciente estaría más propenso a desarrollar una infección (Lee *et al.*, 2013).

Otro aspecto importante, es que las cepas que presentaron el mismo pulsotipo, también muestran el mismo perfil de resistencia y número de plásmidos; no obstante, hay otros subgrupos donde alguna de las cepas pertenecientes, no muestra el mismo perfil de resistencia. Los resultados de PFGE son congruentes con los obtenidos a través del perfil de plásmidos, pero al comparar las ventajas y desventajas de las mismas, podemos resaltar que el PFGE es una técnica que puede llegar a ser tardada, laboriosa y cara con respecto al perfil de plásmidos o a la amplificación del gen *bla*_{OXA-51}; sin embargo, los resultados son más certeros en cuanto a la tipificación de las cepas, la reproducibilidad es alta y además podemos obtener información con respecto a la diversidad genética de las cepas y su relación clonal.

A pesar de que la técnica de PFGE ha sido de las más utilizadas en la tipificación de *A. baumannii*, otra de las más empleadas es la del MLST; esta se basa en la secuenciación de las regiones variables de 7 genes (Larsen *et al.*, 2012). En *A. baumannii* se han descrito y propuesto dos protocolos, mismos que se basan en diferentes genes constitutivos. En este caso, las 66 cepas de estudio fueron analizadas utilizando el protocolo Pasteur, obteniendo 16ST diferentes, siendo la más prevalente la ST156, ST132, ST1166 y la ST2, esta última se ha considerado causante de brotes en otros países (Kubo *et al.*, 2015); además, se ha encontrado que los aislados con esta ST se caracterizan por la presencia de genes *bla*_{OXA-23}, lo cual no ocurre con las cepas de nuestro estudio. Los resultados que obtuvimos a través del MLST, coinciden con los que se obtuvieron por PFGE y perfil de plásmidos, las cepas que presentan la misma ST presentan también el mismo pulsotipo y perfil de plásmidos. Algo sobresaliente de la implementación de esta técnica y en específico del protocolo Pasteur, es que se ha utilizado no sólo para la tipificación de *A. baumannii*, sino que también en la diferenciación de las especies del complejo Acb (Yamada *et al.*, 2016), debido a que hay ST que sólo han sido descritas para *A. pittii* o *A. nosocomialis*; lo anterior concuerda con nuestros resultados, ya que las ST obtenidas para *A. pittii* están descritas en la base de datos del MLST para esta especie.

Seleccionamos 5 cepas para ser caracterizadas mediante el protocolo Oxford, con la finalidad de comparar los esquemas propuestos para MLST en *A. baumannii*. Las cepas seleccionadas fueron aisladas del mismo paciente y tuvieron un origen de aislamiento diferente, tres de ellas fueron aisladas de hemocultivos, 1 de coprocultivo y la última de

autopsia; estas cepas presentaron el mismo perfil de resistencia, los mismos genes *bla*_{OXA} (*bla*_{OXA-51} y *bla*_{OXA-23}), el mismo perfil de plásmidos y secuencia tipo a través del protocolo Pasteur; sin embargo, presentaron diferente pulsotipo, diferenciándose 2 grupos. Al analizar las ST obtenidas por el protocolo Oxford obtuvimos que las cepas presentaron la misma ST:758, lo anterior coincide con lo ya obtenido a través del protocolo Pasteur; sin embargo, otros autores señalan incongruencias con los resultados obtenidos en ambos protocolos (Hamidian *et al.*, 2017), señalando problemas en la amplificación de los genes, asegurando que se debe a un incorrecto diseño de los iniciadores, pues estos se sobreponen con otros genes. Es importante mencionar, que las secuencias nucleotídicas para la determinación de las ST, fueron obtenidas a través de secuenciación masiva, utilizando plataformas de nueva generación; por lo tanto, este estudio es pionero en el empleo de nuevas tecnologías para la obtención de secuencias tipo. La secuenciación masiva permite obtener millones de secuencias en un menor tiempo y costo; las secuencias que obtuvimos tuvieron la cobertura y calidad necesaria para llevar a cabo el ensamble de estas, por lo que se recomienda utilizar esta tecnología. Con base en la experiencia obtenida en la realización de esta técnica, podemos mencionar que en el caso del protocolo Oxford, hay genes en los que la estandarización de la PCR para su amplificación es muy difícil, teniendo incluso que recurrir a la ligación de los amplificados en un vector de clonación; así mismo, uno de los principales problemas de esta técnica es el diseño de los iniciadores, ya que a pesar de que ya estén establecidos en la base de datos, estos podrían ser rediseñados considerando los genes y el tamaño del amplificado de los mismos.

En cuanto a la ST758 es necesario recalcar que pertenece al complejo clonal 636 (CC636), el cual es de importancia epidemiológica en México, ya que se ha demostrado que las cepas con esta secuencia tipo son productoras de carpabenemasas, en especial se ha descrito una nueva variante, la OXA-239; mostrando la diversificación de las Oxas (Tamayo *et al.*, 2014).

Las observaciones anteriores nos permiten concluir que el MLST es una técnica costosa; además, la estandarización de la PCR para la amplificación de los genes y el análisis de los datos puede ser tardado; sin embargo, una vez estandarizada la reproducibilidad de esta técnica es alta permitiendo la tipificación de las cepas, la diferenciación de algunas especies del complejo Acb (como *A. pittii*) y la comparación con cepas aisladas en otras partes del mundo.

Recientemente el polimorfismo observado entre sistemas CRISPR-Cas se ha empleado para genotipificar cepas y establecer relaciones filogenéticas en diversas especies bacterianas; sin embargo, se ha reportado que en algunos casos los espaciadores pueden ser demasiado diversos, dificultando su empleo como método para subtipificar. Por otro lado, el sistema CRISPR-Cas se ha implementado como método de tipificación con éxito en especies como *Salmonella enterica* y *Yersinia pestis* (Shariat *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2008), en otras bacterias como *Erwinia amylovora*, no sólo ha permitido tipificar los aislados, sino también separarlos en diferentes grupos dependiendo de su origen geográfico (Rezzonico *et al.*, 2011)

En *A. baumannii* se han descrito dos sistemas, denominados CRISPR-AYECas1 (Hauck *et al.*, 2012) y CRISPR-Cas subtipo I-Fb (Karah *et al.*, 2015). En este estudio, los sistemas ya mencionados fueron identificados sólo en 25 cepas, siendo el más prevalente el sistema CRISPR-AYECas1 y en 6 aislados se identificó el sistema CRISPR-Cas subtipo I-Fb, cabe señalar que 3 aislados presentaron ambos sistemas. Además de identificar cada uno de los anteriores, se identificó la proteína Cas1; encontrando que sólo 8 cepas la amplificaron, de las anteriores 7 presentaron un tipo de sistema CRISPR-Cas. Se amplificó la proteína Cas1, porque de acuerdo con Makarova y Konin (2015), esta es una de las más conservadas junto con *cas2*, pues si bien está involucrada en la adquisición de espaciadores, la evolución de la misma es más lenta en comparación con otros (Takeuchi *et al.*, 2012); uno de los aislados que amplificó este gen, no amplificó ningún sistema CRISPR-cas por lo que podríamos sugerir la presencia de otro sistema diferente a los buscados en este estudio. Caso contrario sucedió en 17 cepas, que amplificaron alguno de los sistemas, pero no el gen *cas1*; sugiriendo que han perdido la capacidad de adquirir diferentes espaciadores; lo anterior se ha demostrado en cepas de *Enterococcus faecium*, que han perdido la capacidad de agregar espaciadores al locus CRISPR, debido a la delección del gen *cas1* (Lyons *et al.*, 2015).

En cuanto al tamaño de los espaciadores, algo interesante es que los amplificados eran de mayor tamaño en el caso del sistema CRISPR-Cas subtipo I-Fb (700 pb) a diferencia de los del sistema CRISPR-AYE, que tenían un tamaño de entre 200 y 300. Hauck *et al.* (2012) determinaron que había cepas que presentaban sistemas CRISPR más largos y que eso estaba relacionado con la evolución de estos en el ambiente. La detección

de estos sistemas a través de una PCR y de la secuenciación de amplificadores pareciera ser una técnica sencilla de realizar; sin embargo, con base en los resultados obtenidos, no podríamos utilizar el sistema CRISPR-Cas como un método de tipificación para nuestras cepas, pues solo el 38% de las mismas lo amplificó, además sólo en dos casos, aquellas cepas que presentaron el mismo perfil plasmídico, pulsotipo, ST y perfil de resistencia, presentaron también el mismo sistema CRISPR-Cas. Sin embargo, algo que hay que destacar es la probable implicación de estos en otros procesos. En estudios realizados en *E. coli* (Babu *et al.*, 2011) los sistemas CRISPR-Cas parecen estar relacionados con la reparación de daño en el DNA; esto sería relevante en *A. baumannii*, ya que es bien sabido que los microorganismos sometidos a una serie de agentes o presiones ambientales pueden tener daños a nivel del DNA y *A. baumannii* al presentar resistencia a la desecación y estar por lo tanto sometida a procesos de desecación e hidratación puede sufrir daños en el DNA. La presencia del sistema CRISPR-cas podría estar mediando estos procesos; sin embargo, lo anterior debe comprobarse.

Las herramientas utilizadas en este trabajo permitieron la tipificación y determinación de las relaciones genéticas entre las cepas; sin embargo, un aspecto importante que observamos es que las mismas presentaron una alta diversidad; permitiéndonos comprender la distribución de estas especies y sus características; dado que la utilización de estas herramientas no sólo permiten inferir sobre la diversidad de las poblaciones que podrían estar asociadas a los ambientes hospitalarios y las cepas que han persistido a lo largo del tiempo en áreas específicas del hospital, información de relevancia a nivel epidemiológico; debido a que una tipificación adecuada brindará la oportunidad de generar estrategias para evitar la transmisión y persistencia de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario.

10. CONCLUSIÓN

La implementación de diferentes técnicas de tipificación molecular en este estudio permitió la identificación de las cepas del complejo Acb. Las especies del complejo no pudieron ser diferenciadas por otra técnica diferente al MALDI-TOF MS; todas las herramientas brindan información diferente e importante para la identificación y comprensión de la distribución y comportamiento del complejo *A. calcoaceticus-baumannii* en el ambiente hospitalario; sin embargo, la técnica que brinda mejor información en cuanto a la diversidad genética y epidemiología de las cepas es el PFGE, teniendo en cuenta además, que las otras técnicas pueden ser tardadas, difíciles de realizar o interpretar. La implementación del MLST a través de secuenciación masiva aportó información importante relacionada con los complejos clonales y ST identificadas en las cepas de estudio, esta herramienta puede ser introducida de manera eficiente, ya que acorta los tiempos para la obtención de ST; sin embargo, el análisis de las secuencias requiere de experiencia. Una aportación importante de nuestro trabajo es la identificación del sistema CRISPR-Cas en cepas clínicas, aunque la información sobre estos sistemas en *A. baumannii* aún es insuficiente, se busca realizar estudios que permitan dilucidar la importancia de estos mecanismos, sugiriendo que podrían estar implicados en el éxito nosocomial de *A. baumannii*. En este estudio utilizando las diferentes herramientas de tipificación se demostró que más de una cepa de *A. baumannii* está relacionada con la infección del paciente.

11.PERSPECTIVAS

Es importante continuar caracterizando las cepas que pertenecen al complejo Acb, debido a su importancia nosocomial. En este estudio logramos identificar los sistemas CRISPR-Cas que se han descrito en *A. baumannii*; sin embargo, no existen reportes que muestren la relación de estos sistemas con mecanismos de resistencia y virulencia; por lo que se pretende desarrollar estudios que nos permitan conocer el papel y la importancia de estos sistemas en cepas del complejo Acb.

12.LITERATURA CITADA

Allen, J., Huang,D., Cronk,Q., Johnson, K. (2015). aTRAM automated target restricted assembly method a fast method for assembling loci across divergent taxa from next-generation sequencing data. BMC Bioinformatics 16:98 DOI 10.1186/s12859-015-0515-2.

Almirall, M., Cosgaya, C., Higgins, P., Van Assche, A., Telli, M., Huys, G. (2016). MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases S1198-743 (16)30604-8.

Álvarez , Delfín. (2010).Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. Rev haban cienc méd. 9(4): 516-524.

Álvarez, B., Culebras, E., y Picazo, J. (2012). Identification of Acinetobacter species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? Infect Genet Evol.12:345–349.

Andrews, S. (2010). FastQC: una herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento. Disponible en línea en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Babu,M., Beloglazova, N., Flick, R., Graham, C., Skarina, T., Nocek, B., Gagarinova , A., Pogoutse, O., Brown, G., Binkowski, A., Phanse, S., Joachimiak, A., Koonin, E., Savchenko, A., Emili, A., Greenblatt, J., Edwards,AM. , Yakunin AF. (2011) A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. Mol Microbiol. 79:484–502

Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. Wiley Interdiscip Rev RNA . 4:267–278.

Barton, B., Harding, G., y Zuccarelli, A . (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal Blochem. 226, 235–240.

Bartual, S., Seifert, C., Hippler, M., Luzon, H., Wisplinghoff y F. Rodriguez. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 43:4382–4390.

Betancor, L., Gadea, M., Flores, K. (2008). Genética Bacteriana. En: Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3ra Ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR; 65-90.

Bhaya D., Davison, M., Barrangou R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and Archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annu Rev Genet 45: 273-297.

Boerlin, P., Eugster, S., Ganschen, F., Straub, R., Schawalder. (2001). Transmission of opportunistic pathogens in veterinary teaching hospital. Vet Microbiol 82: 347-359.

Bou, G., Oliver, A., y J. Martínez. (2000). OXA-24, a novel class D-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1556–1561.

Brown, S., Young, H., y Amyes S. (2005) Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infect 11: 15–23.

Camacho, R., Ávila, R., López, E., Rodríguez, R., Sánchez, M.H., Yunes, L.M., Velásquez, N.I. (2004). Epidemiología de las infecciones nosocomiales en una unidad de terapia intensiva pediátrica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 24.

Cardozo, A., L. Rodríguez., R. Poutou., A. Carrascal., D. Zambrano. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. Universitas Scientiarum 2:203-222.

Carrillo, A. y García, A. (2007) Betalactamasas de espectro extendido: Importancia clínica Médica. Taller de Laboratorio Clínico. Asociación Española de Biopatología Médica. España.

Chen S, Huang T, Zhou Y. (2017). AfterQC: automatic filtering, trimming, error removing and quality control for fastq data. BMC Bioinformatics;18(S3):80.

Chiang, M., Kuo, S., Chen, S.(2012) Clinical characteristics and outcomes of bacteremia due to different genomic species of *Acinetobacter baumannii* complex in patients with solid tumors.. Infección. 40 (01) 19-26.

Cisneros, J. (1996). Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. Clin. Infect. Dis. 22:1026–1032.

Coelho, J. (2004). Propagación de clones de *Acinetobacter baumannii* productores de OXA-23 en Inglaterra. Clin Microbiol Infect 10: (s3): 535

Coll, P., Coque, M., Domínguez, M., Vázquez, J., Vila, J., (2005). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Croxatto Antony, Prod'hom Guy, Greub Gilbert. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, FEMS Microbiology Reviews, Volume 36, Issue 2, 1 March 2012, Pages 380–407, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>

Cui, Y., Li, Y., Gorge, O., Platonov, M., Yan, Y. (2008) Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. PLoS ONE 3: e2652.

Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. (2008). AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 52 (2): 557-62.

Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., and Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS ONE. 5, e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034 PMID: 20383326

Dirección General de Epidemiología. (2016). Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica . Informe Anual 2014. México, CDMX. 56 pp.

Espinal, P., Seifert, H., Dijkshoorn, L., Vila, J., y Roca, I. (2012). Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect.* 18: 1097–110.

Evans, B., Hamouda, A., Towner, K., Amyes SG. (2008). OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:268–275

Evans, B. y Amyes S. (2014). OXA β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews.* 27 (2) 241-263.

Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, de Romans S, Lim C, Roux C, Passet V, Diancourt L, Guibourdenche M, Issenhuth-Jeanjean S, Achtman M, Brisse S, Sola C, Weill FX. (2012). CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. *PLoS One*, 7(5):e36995. doi: 10.1371/journal.pone.0036995.

Fagerquist, CK. (2017). Unlocking the proteomic information encoded in MALDI-TOF-MS data used for microbial identification and characterization. *Expert Rev Proteomics.* 14:97–107.

Fernández, F., López, L., Rodríguez, J. (2011). The microbiology laboratory's contribution to the surveillance and control of outbreaks caused by nonfermentative Gram-negative bacilli. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 3:40-6.

Fernández, F., L. López., A. Pascual. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31: 20-25.

Fitzpatrick, M., Ozer, E., Hauser, A. (2016). Utility of whole-genome sequencing in characterizing *Acinetobacter* epidemiology and analyzing hospital outbreaks. *J Clin Microbiol* 54:593–612. doi: 10.1128/JCM.01818-15.

Fraser, C., Alm, A., Polz, M., Spratt, B., Hanage, W. (2009). The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science*, 323: 741-746. 10.1126/science.1159388.

García, D., Nociari, M., Sordelli, O., A. Di Martino, y M. Catalano. (1996). The use of plasmid profile analysis and ribotyping for typing *Acinetobacter baumannii* isolates. *J. Hosp. Infect.* 34:139–144.

García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., Solari, S. (2012) Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Rev Chilena Infectol.* 29 (3): 263-72.

Girard, R., Perraud, M., Pruss, A., Savey, A., Tikhomirov, E., Thuriaux, M. (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía Práctica. Organización Mundial de la Salud. 1-71 pp.

Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P. (2010). First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 578–579. 10.1128/AAC.00861-09.

González, M.I. (2010) Mecanismos de resistencia a carbapenemes en cepas de *Acinetobacter baumannii* causantes de infecciones intrahospitalarias. Tesis de grado:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, CDMX. 87 pp.

González, A.M., y Valverde, V. (2016). Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Increasing Success Remains a Challenge as a Nosocomial Pathogen. *Journal of Pathogens*; 10.

Gutiérrez, M. (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev Latin Infect Pediatr.* 30 (2): 68-75.

Grabherr, M., Haas, B., Yassour, M., Levin, J., Thompson, D., Amit I. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology.*, 29: 644–652. pmid:21572440.

Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G. (2008) . On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90:660 – 668. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.014>.

Hamidian, M., Nigro, S. (2017). Problems with the Oxford multilocus sequence typing scheme for *Acinetobacter baumannii*: do sequence type 92 (ST92) and ST109 exist? *J Clin Microbiol* 55:2287–2289. <https://doi.org/10.1128/JCM.00533-17>.

Harding, C., Hennon, S. y Feldman M. (2017). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol*, 16 (2):91-102.

Hauck, Y., Soler, C., Jault, P., Merens, A., Gerome, P. (2012) Diversity of *Acinetobacter baumannii* in four French military hospitals, as assessed by multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *PLoS ONE* 7: e44597. pmid:22984530

Heritier, C. Poriel, L., Fournier, P., Clacerie, D., Raoult, D., Nordmann, P. (2005). Characterization of the naturally occurring oxacilinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chem*, 49: 4174-4179.

Hernández, A., E. García., G. Yagüe y J. Gómez. (2010). *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. *Rev. Esp. Quimioter* 1:12-19.

Hujer, K.M., Hujer, A.M., Hulten, E.A., Bajaksouzian, S., Adams, J.M., Donskey, C.J., et al. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(12):4114-23.

Hsueh, P.R., Kuo, L.C., Chang, T.C., Lee, T.F., Teng, S.H., Chuang, Y.C. (2014). Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Acinetobacter species*. *J Clin Microbiol.* 52: 3095–3100

Hu, J., Robinson, J. (2010) Systematic review of invasive *Acinetobacter* infections in children. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 21: 83–88.

Ikonomidis, A., E. Neou, V. Gogou, G. Vrioni, A. Tsakris, and S. Pournaras. (2009). Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 47:4055–4059. doi:10.1128/JCM.00959-09.

Jansen, R., Embden, J.D., Gaastra, W., Shouls, L. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol microbiol*, 43: 1565-1575.

Karah, N., Samuelsen, Ø., Zarrilli, R., Sahl, J., Wai, S., Uhlin, B. (2015). CRISPR-cas Subtype I-Fb in *Acinetobacter baumannii*: Evolution and Utilization for Strain Subtyping. Mokrousov I, ed. *PLoS ONE*, 2:1-17.

Kempf, M., Rolain, J. (2012) Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39: 105–114.

Kishii, K., Kikuchi, K., Matsuda, N., Yoshida, A., Okuzumi, K., Uetera, Y.(2014). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 20: 424–430.

Ko, K. S., J. Y. Suh, K. T. Kwon, S.-I. Jung, K.-H. Park, C. I. Kang, D. R. Chung, K. R. Peck, and J.-H. Song. (2007). High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:1163–1167.

Kooti, S., Motamedifar M., Sarvari J. (2015). Antibiotic resistance profile and distribution of oxacillinase genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Shiraz teaching hospitals. *Jundishapur J. Microbiol.* 8, e20215, 2015.

Kubo, Y., Komatsu, M., Tanimoto, E., Sugimoto, K., Tanaka, S., Migita, S., Kondo, Y., Yano, S., Maehara, K., Murata, R., Nakamura, A., Fujita, T., Kawata Y. (2015). Spread of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* ST2 and ST246 in a hospital in Japan. *J Med Microbiol* 64:739 –744.

Larsen, M., Consentino, S., Rasmussen, S. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria, *J Clin Microbiol*, vol. 50 (pg. 1355-61)

Larracilla A. J. (2000) Infecciones nosocomiales en niños. Antecedentes en hospitales del tercer nivel de atención, *Rev med IMSS.* 30: 497-505.

Lee, Y., Kuo, S., Yang, S., Lin, Y., Chiang, D., Tseng, F., Chen, T., Fung, C. (2013). Bacteremic nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis*: a single or two distinct clinical entities?. *Clin Microbiol Infect.* 19 (7): 640-645.

Lin L, Ling BD, Li XL. (2009). Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents.* 33 (1): 27-32.

Lin CY, Chen YM, Lin MC. , et al. Risk factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* recurrence after successful eradication in ventilated patients. *Biomed J* 2016; 39 (02) 130-138

Limansky, A. S., M. I. Zamboni, M. C. Guardati, G. Rossignol, E. Campos y A. M. Viale. (2004). Evaluation of phenotypic and genotypic markers for clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Medicina (Buenos Aires)* 64:306–312.

Lyons, C., Raustad, N., Bustos, M.A., Shiaris, M. (2015). Incidence of Type II CRISPR1-Cas Systems in *Enterococcus* Is Species-Dependent. *PLoS One.*;10(11):e0143544. doi: 10.1371/journal.pone.0143544.

López, J., Méndez, A., Bobadilla, R., Zacate, J. (2012). Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc*, 20:85-90.

Lowings, M., Ehlers, MM., Dreyer, AW., Kock MM.(2015) High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa—an update. *BMC Infect Dis*.15(1):521.

Lynch, J., Zhanel, G., Clark, N. (2017). Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: treatment options. *Semin Respir Crit Care Med*. 38: 311–25.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil EJ, Morelli G, Russell JE, et al. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140–3145. pmid:9501229.

Maiden MCJ, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, et al. (2013) MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 11: 728–736. pmid:23979428.

Maragakis, L. y Perl, T. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis*. 46:1254–1263.

Magiorakos, AP., Srinivasan, A., Carey, RB., Carmeli Y., Falagas, ME., Giske CG. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18(3):268-81.

Makarova, K., Koonin, E. (2015). Anotación y clasificación de los sistemas CRISPR-Cas en: Lundgren M, Charpentier E, Fineran PC., Editores. *CRISPR. Métodos y protocolos*. Vol. 1311 Nueva York: Springer; pp. 47-75. ISBN 978-1-4939-2686-2.

Maleki M.H., Z. Sekawi, S. Soroush, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of tetracycline resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from nosocomial infections at Tehran hospitals Iran *J Basic Med Sci*, 17 (1) (2014 Jan), pp. 21-26.

Mancilla, J., Castro, S., Ochoa, S., Bobadilla del Valle, M., Luna, V., Bustos, P., Laris, a., Arellano, J., Parral, I., Hernández, R., Cevallos, M., Xicohtencatl, J., Cruz, A. (2019). Whole-Genome Sequences of Five *Acinetobacter baumannii* Strains From a Child With Leukemia M2. *Front Microbiol*, 10:132. doi: 10.3389/fmicb.2019.00132. eCollection 2019.

Marcos, M., Abdalla, S., Pedraza, F., Andreu, A., Fernandez, F., Gomez, R., Jimenez, (1994). Epidemiological markers of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a spinal cord injury unit. *Hosp Infect*. 28(1):39-48.

Martínez P., y Mattar S. (2012). Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAb1-blaOXA-23,51 and ISAb1-blaADC-7 genes in Montería, Colombia. *Braz. J. Microbiol*. 43:1274–1280.

Martins, A., Kuchenbecker, R., Sukiennik T. (2009) *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenem que produce la enzima OXA-23: diseminación en el sur de Brasil . *Infección* . 37 (05) 474-476

Moradi, J., Hashemi, F., Bahador, A. (2015). Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* in Iran: A Systemic Review of the Published Literatura . *Osong Salud Pública Res Perspect*, 2: 79-86.

Mohanraju P. , K.S. Makarova, B. Zetsche, F. Zhang, E.V. Koonin, J. van der Oost (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems *Science*, 353 p. aad5147

Morejón, M (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272-280. Recuperado el 28 de diciembre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475232013000400006&lng=es&tlng=es.

NOM-026-SSA2-2005. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.

Peleg, A. Y., H. Seifert, y D. L. Paterson(2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538–582.

Pournaras, S., Ikonomidis, A., Markogiannakis, A., Maniatis, A., Tsakris, A. (2005). Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:1055–1056.

Rezzonico, F., Smits, T.H., and Duffy, B. (2011) Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 77: 3819–3829.

Sader, H., Farrell, D., Flamm, R., Jones, R. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana de organismos gramnegativos aislados de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos en hospitales de Estados Unidos y Europa (2009-2011) . *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78 (04) 443-448

Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. (2008). *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin Infect Dis*, 47:444–449.

Seifert, H., L. Dolzani, R. Bressan, T. van der Reijden, B. van Strijen, D. Stefanik, H. Heersma, and L. Dijkshoorn. (2005). Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43:4328–4335.

Shariat, N., Timme, R., Pettengill, J., Barrangou, R., Dudley, E. (2015) Characterization and evolution of Salmonella CRISPR-Cas systems. *Microbiology*.161(Pt 2):374–86.

Silva , S. (2006). Resistencia a los antimicrobianos. *Rev Latinoam Microbiol* , 48:105-112.

Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S., Zervos, MJ. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 19:512-30.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers Microbiol.* 6, 791.

Simmonds, A., Munoz, J., Agüero, M. (2009) Outbreak of *Acinetobacter* infection in extremely low birth weight neonates. *Pediatr Infect Dis J.* 28:210.

Smani Y, Fàbrega A, Roca I, Sánchez-Encinales V, Vila J, Pachón J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(3):1806–1808.

Southern, E., Anand, R., Brown, W., Fletcher, D. (1987). A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 15: 5925-5943.

Takeuchi, N., Wolf, Y., Makarova, K., Koonin, E. (2012). Nature and intensity of selection pressure on CRISPR-associated genes. *J. Bacteriol.* 194:1216–1225.

Tamayo, E., Garza, U., Barrios, H., Sánchez, A., Galicia, P., Meza, A., Silva, J. (2014) Identificación de carbapenemasas OXA-23: variante novedosa OXA-239 en Aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* ST758 en México. *Nuevos microbios Nueva Infect.* 2 : 173–174.

Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239

Turton, J. F., Kaufmann, M., Gill, M., Pike, R., Scott, P., Fishbain, J., Craft, D., Deye, G., Riddell, S., Lindler, L. and T. Pitt. (2006). Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *J. Clin. Microbiol.* 44:2630-2644.

Turton, J. F., M. E. Ward, N. Woodford, M. E. Kaufmann, R. Pike, D. M., Livermore, y T. L. Pitt. (2006). The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258:72–77.

Turkoglu, M., Mirza, E., Tunçcan, O. (2011) Infección por *Acinetobacter baumannii* en pacientes con neoplasias malignas hematológicas en unidad de cuidados intensivos: factores de riesgo e impacto en la mortalidad . *J Crit Care* . 26 (05) 460-467

van Belkum, A., Tassios, P., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B. (2008). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). *Clin Microbiol Infect.* 3:1-46.

Unahalekhaka, A. (2011). Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud. En C. Friedman y W. Newsom. (Ed.), *Conceptos básicos de control de infecciones de IFIC 2da edición* (pp. 29-44). Ireland, Reino Unido: International Federation of Infection Control.

Uwingabiye, J., Lemnouer, A., Baidoo, S. Frinckh, M., Kasouati, J., Maleb, A., Eloennass, M. (2017). Intensive care unit-acquired *Acinetobacter baumannii* infections in a Moroccan teaching hospital: epidemiology, risk factors and outcome. *Germs.* 7(4):193-205.

Vargas L, Vila A, Lanza A, Bonvehi P, Nazar J, Mikietuk A. (2005). Utilidad del sistema VITEK 2® en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 39 (1): 19-25.

Vila, J. (2008). *Acinetobacter baumannii*, the paradigm of multiresistant bacteria. Workshop in Antimicrobial resistance. México, CDMX.

Vincent, J., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A. (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302: 2323–2329.

Waddington, S.N., Privolizzi, R., Karda, R. (2016). A broad overview and review of CRISPR-Cas Technology and Stem Cells. *Curr Stem Cell Rep* , 2: 9-2.

Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. 2005. Metallo-beta-lactamases: ¿the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18:306-325.

Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Tryniszewska E. (2008). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*-the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol* .46 (3): 257-67.

Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H.(2012). Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect*;64:282-90.

World Health Organization (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en>

World Health Organization. (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales : guía práctica / revisores : G. Ducel, J. Fabry y L. Nicolle, 2a ed. Ginebra : Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/iris/handle/10665/67877>

Yamada, Y., Endo, K., Sawase, K., Anetai, M., Narita, K., Hatakeyama, Y., Ishifuji, K., Kurota, M., and Suwabe, A. (2016). Rapid species identification and epidemiological analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. by a PCR-based open reading frame typing method. *Journal of Medical Microbiology*, Epub Ahead of Print.

Yang J., Chen Y., Jia X., Luo Y., Song Q., Zhao W. (2012). Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E506–E513.

13.ANEXOS

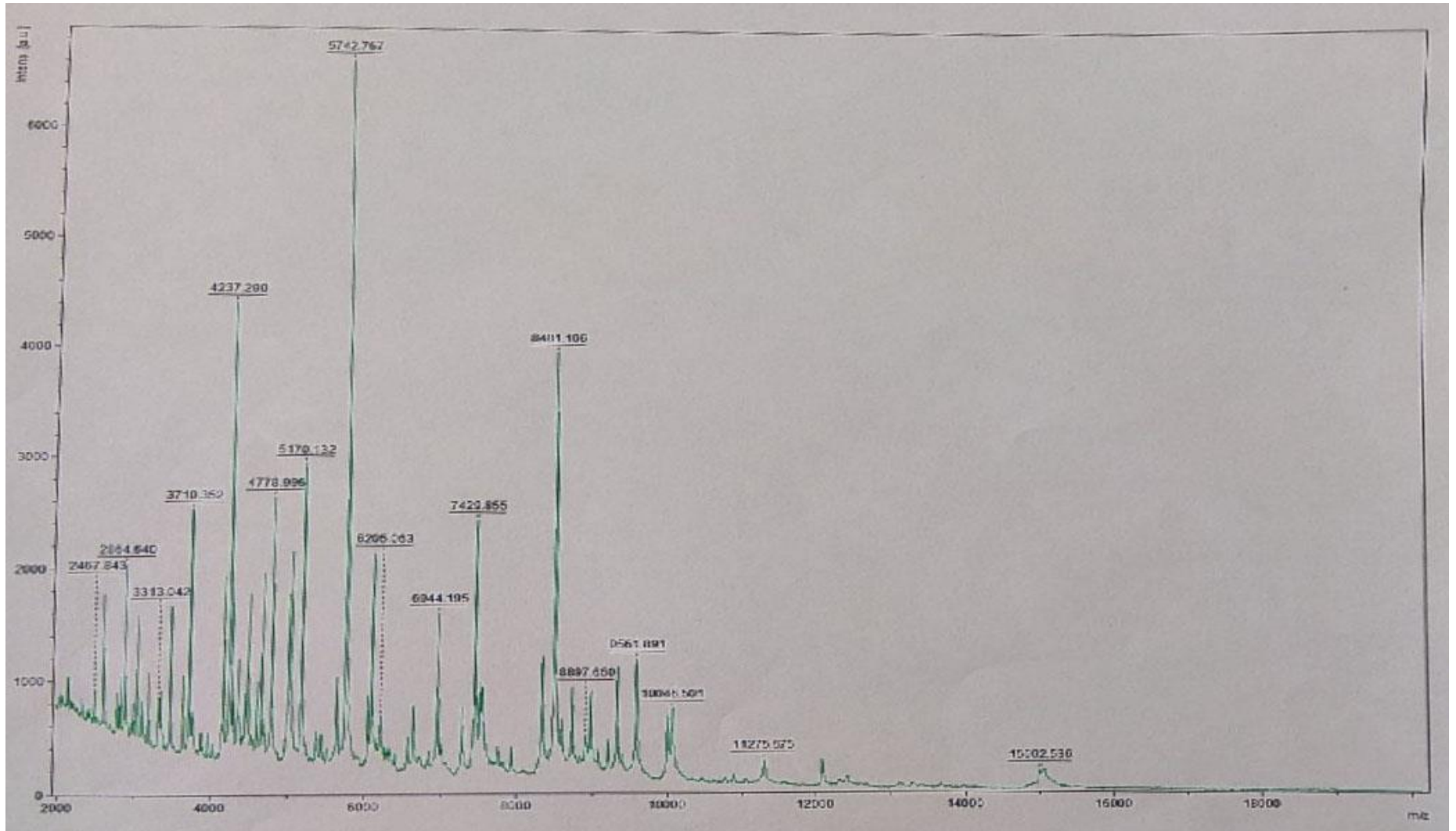
ANEXO 13.1. Preparación de soluciones para el uso de MALDI-TOF MS (Matrix Assited Laser Desorption/Ionization Time -of .-Flight Mass Spectrometry).

Para realizar la identificación de los aislados por medio de MALDI-TOF MS (Matrix Assited Laser Desorption/Ionization Time -of .-Flight Mass Spectrometry), se prepararon previamente las siguientes soluciones:

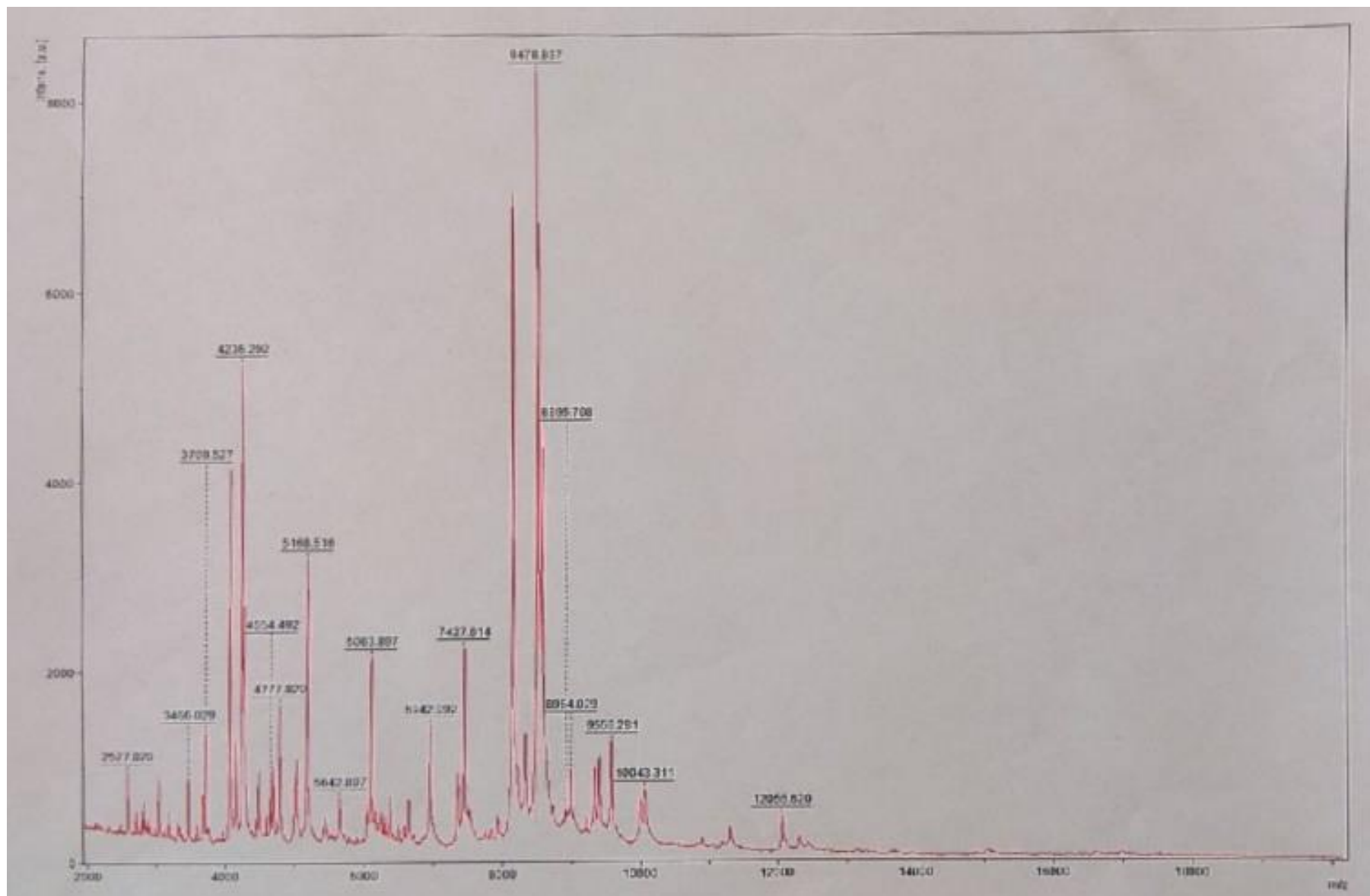
- Solvente orgánico : Para preparar 1 mL de solvente orgánico, se colocó en un tubo eppendorf (1.5 mL) 475 µL agua ultrapura (HPLC-MS), 25 µL ácido trifluoroacético (TFA) y 500 µL acetronilo.
- Acido Fórmico 70%: Para preparar 10 mL de ácido fórmico al 70%, se colocaron 3 ml de agua ultrapura (HPLC-MS) y 7 mL de ácido fórmico al 100%.
- Acetonitrilo al 100%: Se colocaron 10 mL de acetronilo al 100% en un recipiente seguro para productos químicos.
- Etanol al 100%: Se colocaron 50 mL de etanol al 100% en una botella de vidrio, se almacenó a temperatura ambiente.
- Agua ultrapura de grado HPLC-MS: Se colocaron 50 mL de agua en un frasco de vidrio, se almacenó a temperatura ambiente.
- Etanol al 70%: Se colocaron 30 mL de agua filtrada/purificada y 70 mL de etanol al 100%, en una botella de vidrio.
- Ácido trifluoroacético 80%: Para preparar 25 mL de ácido trifluoroacético, se colocaron 5 mL de agua filtrada/purificada, 20 mL de ácido trifluoroacético al 100%
- Solución OS (Solvente Orgánico Básico): 50 µL de acetonitrilo, 475 µL de agua destilada y 25 µL de ácido trifluoroacético puro.
- MATRIZ (50% de acetonitrilo, 2.5 % tri-fluor-ácido acético, designado como OS "solvente orgánico básico": Se agregan 250 µL de OS a un tubo con matriz (HCCA) y se vortexea hasta que los cristales de la matriz estén completamente disueltos.

ANEXO 13.2. Espectros considerados para la identificación de aislados del complejo Acb por medio de MALDI-TOF MS (Matrix Assited Laser Desorption/Ionization Time -of -Flight Mass Spectrometry).

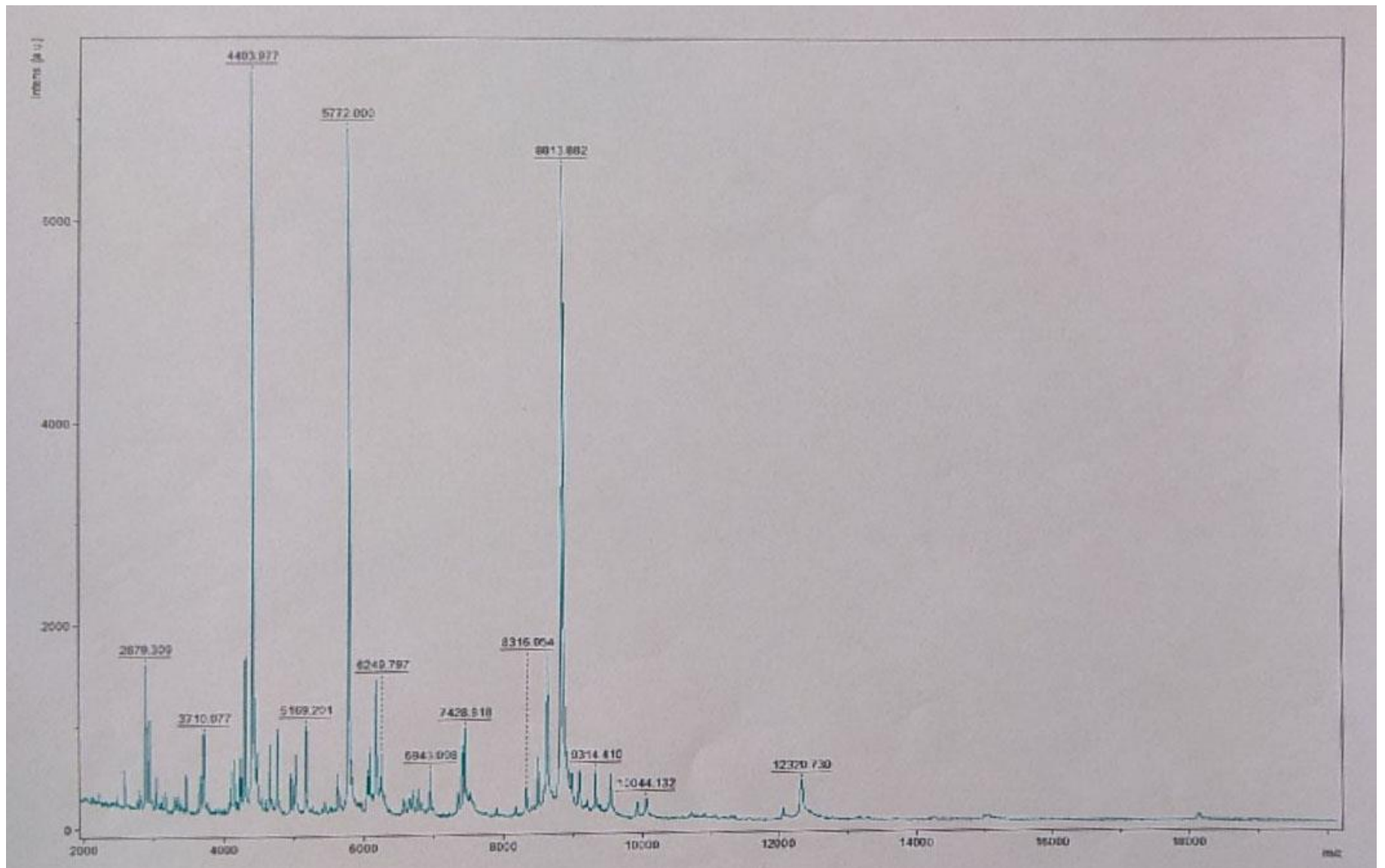
1. *A. baumannii*



2. *A. nosocomialis*



3. *A. pittii*



ANEXO 13.3. Perfil de resistencia.

No. De aislado	Especie	GRUPO	PENICILINAS	BETA-LACTAMASAS/INHIBIDO	CEFALOSPORINAS			CARBAPENEMICOS	AMINOGLUCOSIDOS		TETRACICLINAS	FLUOROQUINOLONAS		FOLATOS	NITROFURANOS	GLUCOLICLINAS
		ANTIBIÓTICO	Ampicilina	Ampicilina/Sulbactam	Cefepima	Ceftazidima	Ceftriaxona	Imipenem	Gentamicina	Tobramicina	Tetraciclina	Ciprofloxacino	Moxifloxacino	Imetoprim/Sulfametoxaz	Nitrofurantoina	Tigeciclina
		Perfil de resistencia	AMP	SAM	FEP	CAZ	CRO	IPM	GEN	TOB	TET	QIP	MXF	SXT	FD	TGC
34H	<i>A. pittii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
49H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
50H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
94H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
831U	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
69D	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S
902U	<i>A. baumannii</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
470H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
471H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
561D	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
361H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
A-13	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
728D	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S
A-2	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S
810CP	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
804U	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
855U	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
873U	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
578H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
769H	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
37D	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
59D	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
330H	<i>A. nosocomialis</i>	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
336H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
785H	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
154D1	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S
154D2	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
539U	<i>A. pittii</i>	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
564U	<i>A. pittii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
219H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
219H1	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
996H	<i>A. baumannii</i>	MDR		R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
714D	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
511U	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
182H	<i>A. nosocomialis</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
901U	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
197D	<i>A. pittii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
139H	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
433H	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
434HRes	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S
483H	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S

837U	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R
916D	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R
960U	<i>A. pittii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
642D	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
209D	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
319U	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
183H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
568H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
111U	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
800H	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
960H	<i>A. pittii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
995H	<i>A. baumannii</i>	MDR		S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
361D	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
471CP	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
740D	<i>A. baumannii</i>	MDR	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
203D	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
745D	<i>A. pittii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
62D	<i>A. nosocomialis</i>	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
173H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
180H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
181H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
268H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
269H	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
434HSens	<i>A. baumannii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

14.APÉNDICES

14.1 Artículo publicado: Whole-Genome Sequences of Five *Acinetobacter baumannii* Strains From a Child With Leukemia M2



Whole-Genome Sequences of Five *Acinetobacter baumannii* Strains From a Child With Leukemia M2

Jetsi Mancilla-Rojano^{1,2}, Semiramis Castro-Jaimes³, Sara A. Ochoa¹, Miriam Bobadilla del Valle⁴, Victor M. Luna-Pineda¹, Patricia Bustos³, Almudena Laris-González⁵, José Arellano-Galindo⁶, Israel Parra-Ortega⁷, Rigoberto Hernández-Castro⁸, Miguel A. Cevallos^{3*}, Juan Xicohtencatl-Cortes^{1*} and Ariadna Cruz-Córdova^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Eric Altermann,
AgResearch (New Zealand),
New Zealand

Reviewed by:

Suleyman Yildirim,
Istanbul Medipol University, Turkey
Zhi Ruan,
Zhejiang University, China

*Correspondence:

Miguel A. Cevallos
mac@ccg.unam.mx
Juan Xicohtencatl-Cortes
juanxico@yahoo.com
Ariadna Cruz-Córdova
ariadnacruz@yahoo.com.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Genomic
Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 05 September 2018

Accepted: 21 January 2019

Published: 06 February 2019

Citation:

Mancilla-Rojano J, Castro-Jaimes S, Ochoa SA, Bobadilla del Valle M, Luna-Pineda VM, Bustos P, Laris-González A, Arellano-Galindo J, Parra-Ortega I, Hernández-Castro R, Cevallos MA, Xicohtencatl-Cortes J and Cruz-Córdova A (2019) Whole-Genome Sequences of Five *Acinetobacter baumannii* Strains From a Child With Leukemia M2. *Front. Microbiol.* 10:132. doi: 10.3389/fmicb.2019.00132

¹ Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico, ² Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³ Centro de Ciencias Genómicas, Programa de Genómica Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ⁴ Departamento de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición "Salvador Zubirán," Mexico City, Mexico, ⁵ Departamento de Epidemiología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico, ⁶ Laboratorio de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico, ⁷ Laboratorio Central, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico, ⁸ Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General "Dr. Manuel Gea González," Mexico City, Mexico

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen and is one of the primary etiological agents of healthcare-associated infections (HAIs). *A. baumannii* infections are difficult to treat due to the intrinsic and acquired antibiotic resistance of strains of this bacterium, which frequently limits therapeutic options. In this study, five *A. baumannii* strains (810CP, 433H, 434H, 483H, and A-2), all of which were isolated from a child with leukemia M2, were characterized through antibiotic susceptibility profiling, the detection of genes encoding carbapenem hydrolyzing oxacillinases, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), adherence and invasion assays toward the A549 cell line, and the whole-genome sequence (WGS). The five strains showed Multidrug resistant (MDR) profiles and amplification of the *bla*_{OXA-23} gene, belonging to ST758 and grouped into two PFGE clusters. WGS of 810CP revealed the presence of a circular chromosome and two small plasmids, pAba810CPa and pAba810CPb. Both plasmids carried genes encoding the Sp1TA system, although resistance genes were not identified. A gene-by-gene comparison analysis was performed among the *A. baumannii* strains isolated in this study and others *A. baumannii* ST758 strains (HIMFG and INCAn), showing that 86% of genes were present in all analyzed strains. Interestingly, the 433H, 434H, and 483H strains varied by 8–10 single-nucleotide variants (SNVs), while the A2 and 810CP strains varied by 46 SNVs. Subsequently, an analysis using BacWGSTdb showed that all of our strains had the same resistance genes and were ST758. However, some variations were observed in relation to virulence genes, mainly in the 810CP strain. The genes involved in the synthesis of hepta-acylated lipooligosaccharides, the *pgaABCD* locus encoding poly- β -1-6-*N*-acetylglucosamine, the *ompA* gene, *Csu pili*, *bap*, the two-component system *bfmts/bfmR*, a member of the phospholipase D family, and two iron-uptake systems were

identified in our *A. baumannii* strains genome. The five *A. baumannii* strains isolated from the child were genetically different and showed important characteristics that promote survival in a hospital environment. The elucidation of their genomic sequences provides important information for understanding their epidemiology, antibiotic resistance, and putative virulence factors.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, resistance, molecular typing, adherence, invasion, virulence factors, whole-genome sequence analysis

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is an emerging opportunistic pathogen involved in healthcare-associated infections (HAIs) with elevated morbidity and mortality, particularly in immunocompromised patients. *A. baumannii* primarily causes ventilator-associated pneumonia and wound and burn infections, but is also an important cause of urinary tract infections and nosocomial septicemia (Gaynes and Edwards, 2005; Dijkshoorn et al., 2007). Treatment for *A. baumannii* infections is complex due to the increasing antibiotic resistance of this pathogen, which involves several intrinsic and acquired resistance mechanisms, such as the production of β -lactamase inhibitors and low-permeability outer membrane and efflux pumps (Peleg et al., 2008). The primary concern regarding HAIs-related *A. baumannii* strains is their high resistance to antibiotic therapy and the appearance of new strains that are resistant to all clinically available antibiotics (Peleg et al., 2008).

The study of the molecular epidemiology of bacterial pathogens is an essential tool for establishing control measures for hospital infections, such as the elimination or prevention of the further spread of *A. baumannii* strains inside a hospital. Diverse molecular typing methods have been used for epidemiological characterization of HAIs pathogens, including *A. baumannii* strains. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is a widely used method of choice to discriminate bacterial strains from nosocomial outbreaks (Urwin and Maiden, 2003). Multilocus sequence typing (MLST) is used to study population structures of bacterial pathogens. Several studies have showed typified *A. baumannii* strains using two MLST methods: the Oxford and Pasteur schemes (Bartual et al., 2005; Diancourt et al., 2010).

A study of *A. baumannii* of several outbreaks from different countries using the Oxford scheme and PFGE analysis identified a sequence type (ST) with the same subdivision, whereas the Pasteur scheme did not identify differences between outbreaks. Additionally, a major resolution of different outbreaks, including the identification of *gpi* and *gyrB* genes, has been described with the Oxford scheme, although this method is still less discriminative than the PFGE test (Tomaschek et al., 2016). Whole-genome sequencing (WGS) allows putative virulence factors of clinical bacterial strains to be identified (Beres et al., 2010), and in the case of hospital outbreaks, WGS allows colonized patients to be identified and to distinguish the possible transmission route of bacterial populations (Reuter et al., 2013). However, the discrimination criteria for clinical strains from outbreaks and non-outbreaks, as well as between clonal lineages,

is not always clearly defined using WGS, and epidemiological data are still required (Leekitcharoenphon et al., 2014). However, the number of SNVs observed between isolates in a temporal frame may bring attention to a putative outbreak (Eyre et al., 2013; Inns et al., 2017). In contrast, the criteria used to establish and discriminate bacteria involved in hospital and nonhospital outbreaks have been well described using PFGE, Rep-polymerase chain reaction (PCR), and MLST tests (Fitzpatrick et al., 2016; Willems et al., 2016).

Comparative genomic analyses of some hypervirulent *A. baumannii* strains have allowed for genomic regions to be identified that contribute to the acquisition of antibiotic resistance, the establishment of colonization and invasion, and ST classification without the MLST analysis requirement (Ou et al., 2015; Zhang et al., 2018). The ST of clinical strains provides relevant information regarding the origin of clonal complexes, including their population distribution, which is epidemiologically important (Higgins et al., 2012). The goal of this study was to compare five *A. baumannii* strains isolated from a child with leukemia M2 using classical molecular typing (PFGE and MLST) and WGS using Illumina and PacBio platforms.

MATERIALS AND METHODS

Identification of *A. baumannii* Strains

The *A. baumannii* strains were cultured on Brucella blood agar from BD Difco (Madrid, Spain) and phenotypically identified at the Laboratorio Clínico Central of HIMFG using a Vitek[®] 2 automated system (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

Antibiotic Susceptibility Tests

Antibiotic susceptibility testing was performed using the broth microdilution method. The antibiotics evaluated included the following: piperacillin (penicillin); piperacillin-tazobactam (β -lactam combination agents); ceftazidime, and ceftriaxone (cephems); imipenem and meropenem (carbapenems); colistin (lipopeptide); gentamicin (aminoglycoside); ciprofloxacin and levofloxacin (fluoroquinolones); trimethoprim-sulfamethoxazole (folate pathway antagonists); and tigecycline (glycylcycline). *A. baumannii* ATCC[®]19606TM was used as a quality control strain, and classification was performed according to the Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI], 2018. Susceptibility to tigecycline was interpreted according to the US Food and Drug Administration (FDA) breakpoints for Enterobacteriaceae.

Detection of *bla*_{OXA-LIKE} Carbapenemase Genes

Genomic DNA was extracted from the *A. baumannii* strains using a Quick-DNA Universal kit (Zymo, Irvine, CA, United States), and the *bla*_{OXA-LIKE} genes were amplified by PCR. The specific primers used for PCR are listed in **Table 1**. PCR assays were performed using the following thermocycling conditions: 94°C for 5 min; 30 cycles at 94°C for 25 s, 52°C for 40 s, and 72°C for 50 s; and a final cycle at 72°C for 6 min. The DNA products were separated by electrophoresis in 1.8% agarose gels and stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide solution. The stained gels were visualized and analyzed under a transilluminator (Bio-Rad, San Francisco, CA, United States). *A. baumannii* ATCC®19606TM was used as a positive control for *bla*_{OXA-51}.

PFGE Assays

The *A. baumannii* strains were plated onto Brucella blood agar and incubated at 37°C for 18 h. Approximately 5–10 colonies were selected and resuspended in 1 mL of Negative Gram Suspension Buffer (NGSB) (100 mM Tris-HCl and 100 mM EDTA 100, pH 8). From this bacterial suspension, 400 µL was embedded into 1% agarose plugs (SeaKem, Cambrex, Rockland, MD, United States), lysed with 5 mL of lysis buffer at pH 8.0 [0.5 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 1% *N*-lauryl sarcosine sodium salt, and 25 µL of proteinase K (20 mg/mL)] with

constant stirring (200 rpm) and incubated overnight at 54 ± 2°C. Subsequently, the samples were washed (MilliQ water at 50°C and 6× TE buffer) and digested with the enzyme *ApaI* (Promega, Madison, WI, United States). The digested chromosomal DNA was electrophoresed on 1% agarose gels (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) using the CHEF MAPPER system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) in 0.5× TBE (AMRESCO, United States) under the following conditions: initial time of 5.0 s, final time of 30.0 s, 6 V/cm, with an inclination angle of 120 and a running time of 24 h. A lambda marker (Biolabs, Hertfordshire, United Kingdom) was used as molecular weight marker. Subsequently, the gels were stained with 0.5 mg/mL of ethidium bromide for 40 min and visualized under UV light. The DNA fragment patterns generated by PFGE were analyzed and compared using NTSYS version 2.2 (Applied Biostatistics, Setauket, New York, NY, United States) with the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) algorithm and the DICE correlation coefficient (Tenover et al., 1995).

MLST

Amplification of the seven housekeeping genes (OXFORD scheme) was performed according to the protocol proposed by Bartual et al. (2005) using the specific primers listed in **Table 1**.

Polymerase chain reactions contained 100 ng of genomic DNA from each strain for the five genes (*gltA*, *gyrB*, *recA*, *cpn60*, and

TABLE 1 | Specific primers used to amplify *bla*_{OXA-LIKE} genes and MLST data.

Gene	Primer sequences 5'-3'	Amplified (bp)	PCR	Reference
<i>bla</i> _{OXA-23}	GATCGGATTGGAGAA CAGA ATTTCTGACCGCATTCCAT	501	OXA	Hujer et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-24}	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGACGCAAAAGGGGATT	246	OXA	Hujer et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-51}	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGCATTGCACTTCATCTTGG	353	OXA	Hujer et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-58}	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	453	OXA	Hujer et al., 2006
<i>gltA</i> F	AAT TTACAGTGGCACATTAGGTCCC	722	MLST	Bartual et al., 2005
<i>gltA</i> R	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG		Amp/Seq	
<i>gyrB</i> F	TGAAGG CGGCTTATCTGAGT	594	MLST	Bartual et al., 2005
<i>gyrB</i> R	GCTGGGTCTTTTCCTGACA		Amp/Seq	
<i>gdhB</i> 1F	GCTACTTTTATGCAACAGAGCC	774	MLST Amp	Bartual et al., 2005
<i>gdh</i> secF	ACCATGCTTTGTTATG		Seq	
<i>gdhB</i> 775R	GTTGAGTTGGCGTATGTTGTGC	774	MLST Amp	Bartual et al., 2005
<i>gdh</i> secR	GTTGGCGTATGTTGTGC		Seq	
<i>recA</i> F	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	425	MLST	Bartual et al., 2005
<i>recA</i> R	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		Amp/Seq	
<i>cpn60</i> F	GGTGCTCAACTTGTTCGTGA	640	MLST	Bartual et al., 2005
<i>cpn60</i> R	CACCGAAACCAGGAGCTTTA		Amp/Seq	
<i>gpi</i> F	GAAATTTCCGGAGCTCACAA	456	MLST	Bartual et al., 2005
<i>gpi</i> R	TCA GGA GCA ATACCCCACTC		Amp/Seq	
<i>rpoD</i> F	ACC CGT GAA GGT GAA ATC AG	672	MLST	Bartual et al., 2005
<i>rpoD</i> R	TTC AGC TGG AGC TTT AGC AAT		Amp/Seq	

OXA-23 (*bla*_{OXA-23}), *OXA-24* (*bla*_{OXA-24}), *OXA-51* (*bla*_{OXA-51}), and *OXA-58* (*bla*_{OXA-58}). Citrate synthase (*gltA*), DNA gyrase subunit B (*gyrB*), glucose dehydrogenase B (*gdhB*), homologous recombination factor (*recA*), 60-kDa chaperonin (*cpn60*), glucose-6 phosphate isomerase (*gpi*); RNA polymerase sigma factor (*rpoD*). Amp, Amplification; Seq, sequencing.

rpoD) and the following PCR thermocycling conditions were used: 94°C for 2 min; 35 cycles at 94°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 30 s; and a final cycle of 72°C for 5 min. For the *gdhB* and *gpi* genes, the following PCR thermocycling conditions were used: 94°C for 5 min; 35 cycles at 94°C for 1 min, 57°C for 1 min, and 72°C for 2 min; and a final cycle at 72°C for 7 min. The DNA amplicons were resolved in 1.0% agarose gels in TAE 1× buffer, stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide, and visualized under a transilluminator.

Only the *gdhB* and *gpi* genes were cloned. The DNA products were ligated into the cloning vector pJet1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Subsequently, the ligation mixture was used to transform *E. coli* DH5α competent cells, and the resulting colonies carrying the genes cloned into the pJet1.2/blunt vector were verified by PCR assays. The transformed plasmid was extracted using a Plasmid Miniprep kit (Zymo, Irvine, CA, United States), purified, and sequenced by Sanger sequencing. The sequencing reaction was performed using specific primers corresponding to the housekeeping and the cloning vector pJET1.2/blunt using BigDye-Terminator v3.1 Cycle Sequencing and an automatic ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States). The obtained sequences for each gene were analyzed using the database for *A. baumannii* strains¹ and characterized by a pattern defining its ST.

Adherence Assays

The type II pneumocyte cell line A549, derived from human lung carcinoma (A549 ATCC®CCL85; Manassas, VA, United States), was cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium from GIBCO (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) from GIBCO (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States). Briefly, cell monolayers at 70–80% confluence in 24-well plates containing 1 mL of RPMI 1640 medium were infected at a MOI of 100:1 and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 4 h. The *A. baumannii* strains used to infect the A549 cells were cultured in Brain Heart Infusion (BHI) broth overnight at 37°C. The nonattached bacteria were removed and washed three times with 1× PBS. Subsequently, the bacteria attached to the cell monolayers were removed by adding 1 mL of 0.1% Triton X-100 (Amresco, Solon, OH, United States), and serial dilutions were plated onto BHI agar plates and incubated to determine the number of colony-forming units (CFU)/mL. The adherence assays were performed in triplicate on three different days, and the data are expressed as the mean of the averages.

Invasion Assays

The A549 cell monolayers were prepared and infected as previously described in the adherence assay section. The infected cell monolayers were washed with 1× PBS and incubated with RPMI 1640 medium supplemented with 300 μg/mL lysozyme (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, United States) and 300 μg/mL gentamicin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, United States) for 2 h at 37°C with 5% CO₂. The infected cell monolayers were washed

three times with 1× PBS, detached with 1 mL of 0.1% Triton X-100, and plated onto BHI agar plates. The invasion frequency was calculated as the number of surviving bacteria after treatment with gentamycin and lysozyme divided by the total number of quantified bacteria from the adherence assays (Arikawa and Nishikawa, 2010). The invasion assays were performed in triplicate on three different days, and the data are expressed as the mean of the averages.

Whole-Genome Sequence Analysis

DNA from the *A. baumannii* strains was obtained using a Puregene Yeast/Bact Kit B from Qiagen following the manufacturer's instructions. The complete genomic sequence of strain 810CP was generated using reads from one SMRT cell of a PacBio RSII platform. The subreads were assembled *de novo* using the RS hierarchical genome assembly process (HGAP) protocol version 3 in SMRT analysis version 2.3 (Pacific Biosciences). To improve regions of low coverage, a genomic DNA shotgun library was prepared using the standard Illumina TruSeq protocol. Sequencing was performed using Illumina Nextseq500 2 × 75 bp paired-end chemistry, and a hybrid assembly was constructed using Unicycler v0.4.1 (Wick et al., 2017). Contigs corresponding to the chromosome and plasmids in the hybrid assembly were circularized both with Unicycler and a Perl script (available at <https://github.com/jfass/apc>). Draft genomic sequences of strains 433H, 434H, 483H, and A2 were obtained using Illumina Nextseq500 2 × 75 bp, and the reads were assembled with SPAdes 3.11.0. The sequence statistics are shown in **Supplementary Table 1**. Functional annotation was performed using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline and Prokka (Seemann, 2014). Reads were realigned against the final assemblies with bwa-mem (Li and Durbin, 2009), and genomic coverage was calculated using bedtools genomecov (Quinlan, 2014). The acquired antibiotic-resistance genes were identified using ResFinder (Zankari et al., 2012) and the BacWGSTdb platform (Ruan and Feng, 2016). Insertion sequences (ISs) were identified with ISfinder² (Siguiet et al., 2006). Prophage-related sequences were identified using PHAST³ (Zhou et al., 2011). Genomic islands were predicted using IslandViewer 4 with the SIGI–HMM algorithm, which is part of this computational suit (Waack et al., 2006; Bertelli et al., 2017). Virulence-associated genes were identified using the virulence factor database (VFDB)⁴ (Chen et al., 2005) and the BacWGSTdb platform (Ruan and Feng, 2016). Images of genome comparisons were generated using GenVision, a component of the DNASTAR Lasergene Core Suite. The complete genomes obtained in the present study were compared, and against other Mexican strains belonging to ST758 (Graña-Miraglia et al., 2017) using MUMmer 3.0 (Kurtz et al., 2004) and BLAST (Altschul et al., 1990). Gene content matrices were obtained using Roary (Page et al., 2015), with a minimum 90% identity between coding sequences (CDS) as a requisite for a gene to belong to the same family. Single-nucleotide variants (SNVs) between pairs of strains were assessed

¹<http://pubmlst.org/abaumannii/>

²<http://www-is.biotoul.fr>

³<http://phast.wishartlab.com>

⁴<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>

using MUMmer from unambiguous mappings. In addition, SNVs from monocopy core genes with no recombination signal detected by PhiPack (Bruen et al., 2006) were extracted using single nucleotide polymorphism (SNP) sites (Page et al., 2015). SNVs counts (omitting indels) and gene content matrices were plotted with ComplexHeatmap (Gu et al., 2016) in R 3.2.2.

Statistical Analyses

The data were analyzed using IBM SPSS version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, United States). Student's *t*-test was used to compare the adherence and invasion among the clinical strains and ATCC®19606™, and $p \leq 0.05$ was regarded as significant.

GenBank Accession Number

The GenBank accession numbers of the genome sequences obtained or used in this study are listed in Supplementary Table 2.

RESULTS

Clinical Description

The pediatric patient was previously healthy, presented at Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) in December 2014 for pancytopenia and a mediastinal tumor, and by means of bone marrow aspirate, the patient was diagnosed with acute myeloid leukemia subtype M2. Two weeks after receiving the first cycle of chemotherapy, the patient was admitted to the emergency ward for a 24-h evaluation, which was characterized by a fever of 38°C, vomiting, colicky abdominal pain, and decreased stools. The patient did not improve with crystalloid administration and therefore required management with vasoactive drugs. Subsequently, the patient was diagnosed with septic shock, and antimicrobial therapy (meropenem, vancomycin, and amphotericin B) was initiated. The blood cultures and uroculture showed no development of microorganisms.

The pediatric patient entered intensive care for advanced management, persistent high-grade fever, and a systemic inflammatory response with persistence of profound

neutropenia. Treatment with voriconazole was supplementary due to suspicion of pulmonary aspergillosis and without improvement in the thermal curve. On the eighth day of hospitalization, the patient presented hemodynamic deterioration with septic shock, which required orotracheal intubation and the reinitiation of vasoactive amines. However, the patient died in less than 24 h due to torpid evolution with septic shock refractory to amines, conditioned acute renal injury, disseminated intravascular coagulation, ventilator deterioration, and multiple organ failure. A total of five strains were obtained from this patient, the first strain was isolated on January 7, 2015 from stool (strain 810CP). Subsequently, three additional strains were isolated on January 11, 2015 from the bloodstream at different times (strains 433H, 434H, and 483H), and a final strain isolated on January 12, 2015 from cerebrospinal fluid (strain A-2) after performing an autopsy.

A. baumannii Strains Were Multidrug Resistant (MDR)

The MIC values for all *A. baumannii* strains exhibited resistance to the following six categories of antibiotics: penicillin, the β -lactam combination, cephem, carbapenems, fluoroquinolones, and the folate pathway antagonists. Only two strains were resistant to gentamycin (433H and A-2). Additionally, the *A. baumannii* strains showed a susceptibility profile to the lipopeptide and glycolcycline categories (Table 2).

A. baumannii Strains Harboring *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} Genes

To determine whether the five *A. baumannii* strains harbored genes related to carbapenem resistance, the presence of *bla*_{OXA-LIKE} genes was assessed by PCR assays. From the five *A. baumannii* strains, a 353-bp product was amplified that corresponded to the *bla*_{OXA-51} gene encoding OXA-51, an intrinsic oxacillinase, and a 501-bp product corresponding to the *bla*_{OXA-23} gene encoding OXA-23, an oxacillinase associated with carbapenem resistance (data not shown). In addition, the genes encoding OXA-24 and OXA-48 were not identified in the five *A. baumannii* strains.

TABLE 2 | Resistance profiles of *A. baumannii* strains.

Clinical isolate	Antibiotics (MIC μ g/mL)										
	PIP	TZP	CAZ	CRO	IPM	MEM	CL	GM	CIP	SXT	TGC
810CP	256	256/4	128	256	64	64	1	8	8	32/608	2
433H	256	256/4	128	256	32	64	1	16	8	32/608	2
434H	256	256/4	128	256	64	64	1	8	8	32/608	2
483H	256	256/4	128	256	64	64	1	8	8	32/608	2
A-2	256	256/4	128	256	32	32	1	16	8	32/608	2
ATCC®19606™	32	64/4	32	32	0.25	0.5	0.5	4	1	304/16	2
Cut-off	≥ 128	$\geq 128/4$	≥ 32	≥ 64	≥ 8	≥ 8	≥ 4	≥ 16	≥ 4	$\geq 4/76$	≥ 8
%R	100	100	100	100	100	100	0	40	100	100	0

Piperacillin (PIP), piperacillin/tazobactam (TZP), ceftazidime (CAZ), ceftriaxone (CRO), imipenem (IPM), meropenem (MEM), colistin (CL), gentamicin (GM), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), tigecycline (TGC), *Cut-off values for resistance to MIC (μ g/mL), percentage of resistant (%R).

Clonal Relationship of the *A. baumannii* Strains

In this study, the *A. baumannii* strains obtained at different times from the same patient were evaluated for their clonal type based on PFGE pattern analyses. The five strains were grouped in two clusters, I and II; while, *A. baumannii* strain ATCC®19606™ was grouped as an independent cluster. These clusters displayed a macrorestriction pattern consisting of DNA fragments with molecular weights of 48.5 to 339.5 kb. In cluster I, *A. baumannii* strains A-2 and 810CP showed an identical macrorestriction pattern. In cluster II, *A. baumannii* strains 433H, 434H, and 483H also showed the same macrorestriction pattern, while the *A. baumannii* strain ATCC®19606™ was grouped into cluster III. A DICE correlation of 0.9993 and a 95% similarity index was determined in comparisons among the five *A. baumannii* strains. *Salmonella enterica* serotype Newport AM01144 was used as an external control (Figure 1).

Identification of STs in the *A. baumannii* Strains

Multilocus sequence typing sequences of the five *A. baumannii* strains belonged to ST758 with the following allelic profile: *cpn60* (28); *gdhB* (8); *gltA* (1); *gpi* (106); *gyrB* (17); *recA* (10); and *rpoD* (32). According to eBURST, ST758 belongs to clonal complex 636 and shares the same distribution cluster with the other highly frequent STs (Figure 2).

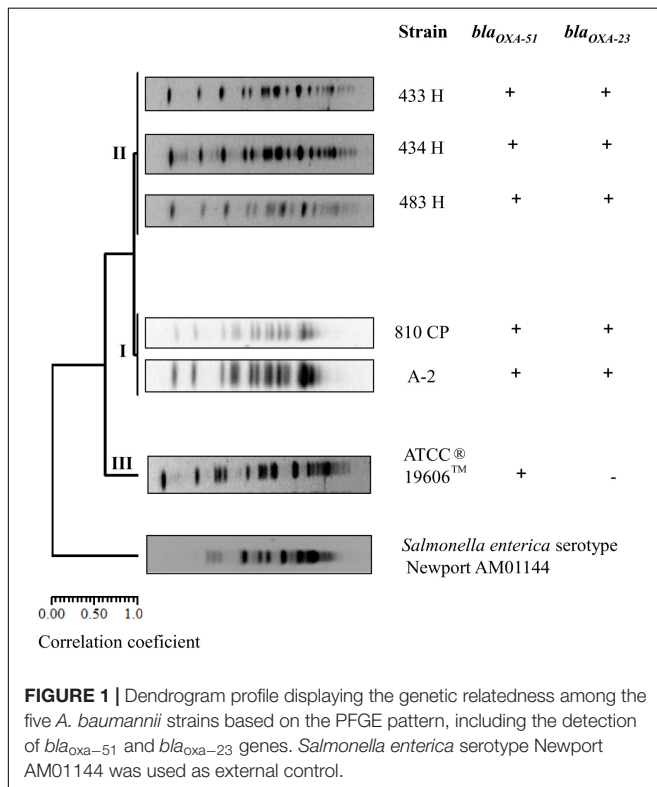


FIGURE 1 | Dendrogram profile displaying the genetic relatedness among the five *A. baumannii* strains based on the PFGE pattern, including the detection of *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-23} genes. *Salmonella enterica* serotype Newport AM01144 was used as external control.

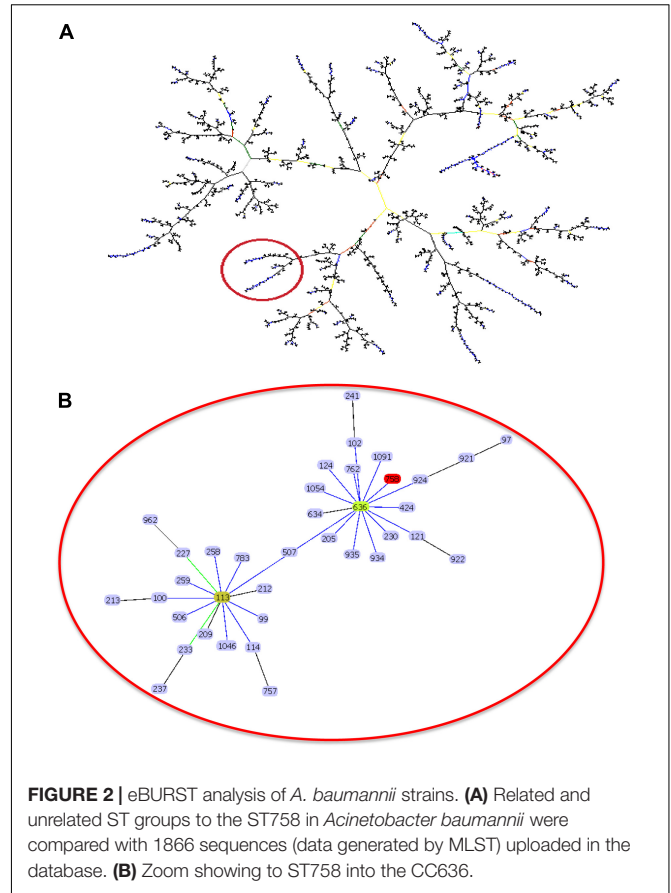


FIGURE 2 | eBURST analysis of *A. baumannii* strains. (A) Related and unrelated ST groups to the ST758 in *Acinetobacter baumannii* were compared with 1866 sequences (data generated by MLST) uploaded in the database. (B) Zoom showing to ST758 into the CC636.

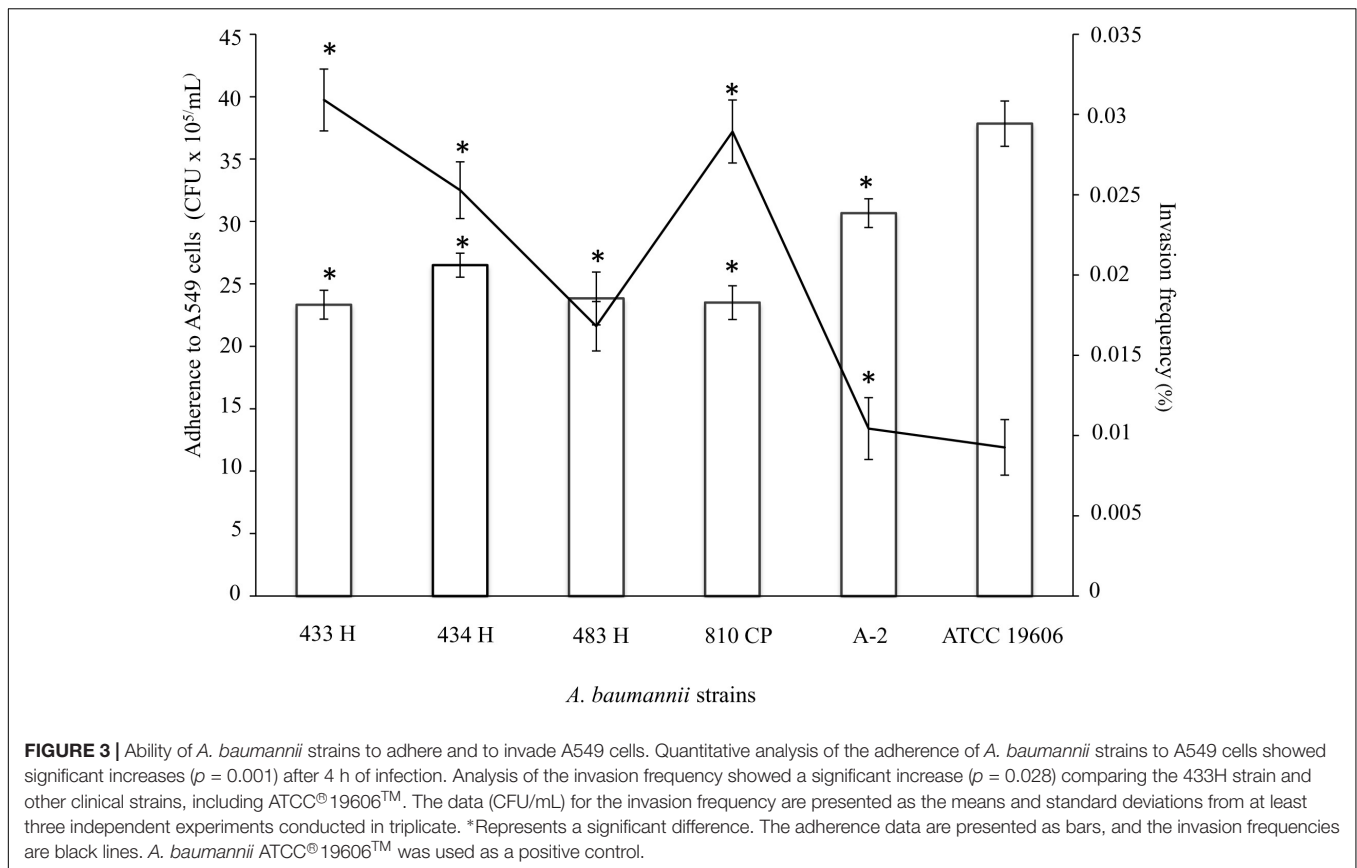
A. baumannii Strains Could Adhere to, but Not Invade, A549 Cells

The adherence profile of the *A. baumannii* strain ATCC®19606™ toward A549 cells after a 4-h infection showed a mean value of 37.8×10^6 CFU/mL, significantly greater ($p = 0.001$) than the adherence profiles of the *A. baumannii* strains isolated in this study, which exhibited mean values between 23.3×10^6 and 30.6×10^6 CFU/mL (Figure 3).

In contrast, the invasion assay using *A. baumannii* ATCC®19606™ showed a 0.005% invasion frequency, which was significantly lower ($p = 0.028$) than the invasion frequency values of the *A. baumannii* strains isolated in this study (between 0.010 and 0.03%) (Figure 3). However, the *A. baumannii* strains and ATCC®19606™ showed lower invasion frequency values than other *A. baumannii* strains.

Sequencing of the Whole Genome of 810CP

To gain further insights into the genomic structure of *A. baumannii*, the complete genomic sequence of the 810CP strain was obtained using Illumina and PacBio platforms. Our analysis showed that the genome of 810CP consisted of a circular chromosome and two small plasmids (pAba810CPa and pAba810CPb). The general features of this genome are listed in Table 3.



Genomic and Phage-Related Islands

The 810CP genome possesses a large number of IS elements, especially ISAbA27, which is present at 16 chromosomal loci and occurs once in the largest plasmid pAba810CPb (Table 3, Figure 4, and Supplementary Table 3). This genome also contains 11 genomic islands, one of which encodes an essentially hypothetical protein. A 9996-bp resistance island carries genes that confer resistance to aminoglycoside and sulfonamide, as well as other genes encoding three transposases of different families associated with ISL3, IS6, and IS91 (Table 3). Seven regions containing phage-related genes are interspersed throughout the 810CP genome (Figure 4). The largest region is 49498 bp, which was present in only the 810CP strain among the *A. baumannii* genome sequences available in GenBank. Interestingly, these phage-related gene clusters are the most notable differences when comparing the 810CP chromosome sequence with other *A. baumannii* chromosomes sharing at least 90% coverage and 99% nucleotide identity (Figure 4).

Antibiotic and Heavy Metal-Resistance Genes

The 810CP genome has a wide range of genes involved in antibiotic and heavy metal resistance. The 810CP chromosome, like most *A. baumannii* strains, carries two genes (*bla*_{ACD-25} and *bla*_{OXA-65}) that are related to resistance to β -lactam antibiotics. The *bla*_{ACD-25} gene encodes an AmpC-type β -lactamase (cephalosporinase) that is adjacent to an ISAbA1 element. The *bla*_{OXA-65} (*bla*_{OXA-51-like}) gene encodes a low-level

carbapenemase. In the *A. baumannii* 810CP strain, a *bla*_{OXA-239} gene was also identified, which is an allele belonging to the OXA-23 carbapenem-hydrolyzing class D family and is tightly linked to the ISAbA1 element. This strain also contains the *strA* gene, which is involved in streptomycin resistance and associated with another ISAbA1 element.

As previously mentioned, the 810CP genome possesses an antibiotic resistance island containing an *aac*(6′)-Ia gene involved in resistance to aminoglycosides and a *sul2* gene linked to sulfonamide resistance. In addition, this strain carries a gene encoding an MdfA efflux pump and has two different chloramphenicol acetyltransferase genes, both of which are linked to a universal stress protein gene. The 810CP strain contains several genes involved in copper resistance that are interspersed throughout its genome. These genes encode proteins that include a TonB-dependent copper receptor (*btuB_2*), the copper-resistance protein CopB, and the copper-homeostasis protein NlpE.

Virulence-Associated Genes

Virulence genes in the 810CP strain were identified using the VFDB collection as queries in a BLASTn search, the results of which are listed in Supplementary Table 4. Briefly, in the 810CP genome, we identified the genes *lpxB*, *lpxD*, *lpxM*, and *lpsB*, which are involved in the synthesis of hepta-acylated lipooligosaccharides (LOS). Genes involved in capsule synthesis were identified within a large cluster in the 810CP chromosome

TABLE 3 | General features of the genome of *A. baumannii* 810CP.

Features	Chromosome	pAba810CPa	pAba810CPb
Length in bp	4,089,681	5,281	16,095
GC%	39.05	36.77	35.32
Number of protein-coding genes	3,812	8	18
Number of rRNA operons	6	0	0
Number of tRNA/ncRNA/tmRNA genes	67/5/1	0	0
Number of insertion sequences (ISs)	ISAba1 (8) ISAba27 (16) ISAba33 (8) ISAba40 (1) ISAba43 (1)	ISAba27 (1)	0

(Supplementary Table 4). Based on the sequencing analysis, we also identified the *pgaABC* locus, encoding proteins involved in the production of poly-β-1-6-*N*-acetylglucosamine, as well as the *ompA* gene, encoding a major component of the outer membrane protein (OmpA), a trimeric porin involved in solute

transport and biofilm formation. Other genes with a role in biofilm formation and involved in the synthesis of the Csu pili and the two-component system BfmS were also identified. The 810CP genome also possesses a gene encoding Bap (biofilm-associated protein, locus-tag *Aba810CP_04235*), a protein with multiple immunoglobulin-like domains localized on the cell surface. Genes encoding the AdeFGH resistance–modulation–cell division (RND)-type efflux system were identified using the VFDB. In the chromosome of *A. baumannii* 810CP, two genes (locus-tag *Aba810CP_02675* and *Aba810CP_09700*) were identified encoding the phospholipase D family and two types of phospholipase C, one gene (locus_tag *Aba810CP_19600*) with a match in the VFDB, and a third gene annotated only as “phospholipase.”

In addition, we identified a gene encoding PbpG (locus_tag *Aba810CP_18695*) and genes involved in the synthesis of two iron-uptake systems mediated by the siderophore acinetobactin.

Plasmids

Acinetobacter baumannii 810CP possesses two plasmids: pAba810CPa (5281 bp) and pAba810CPb (16095 bp) (Figure 4). The plasmid pAba810CPa harbors only six predicted ORFs, one

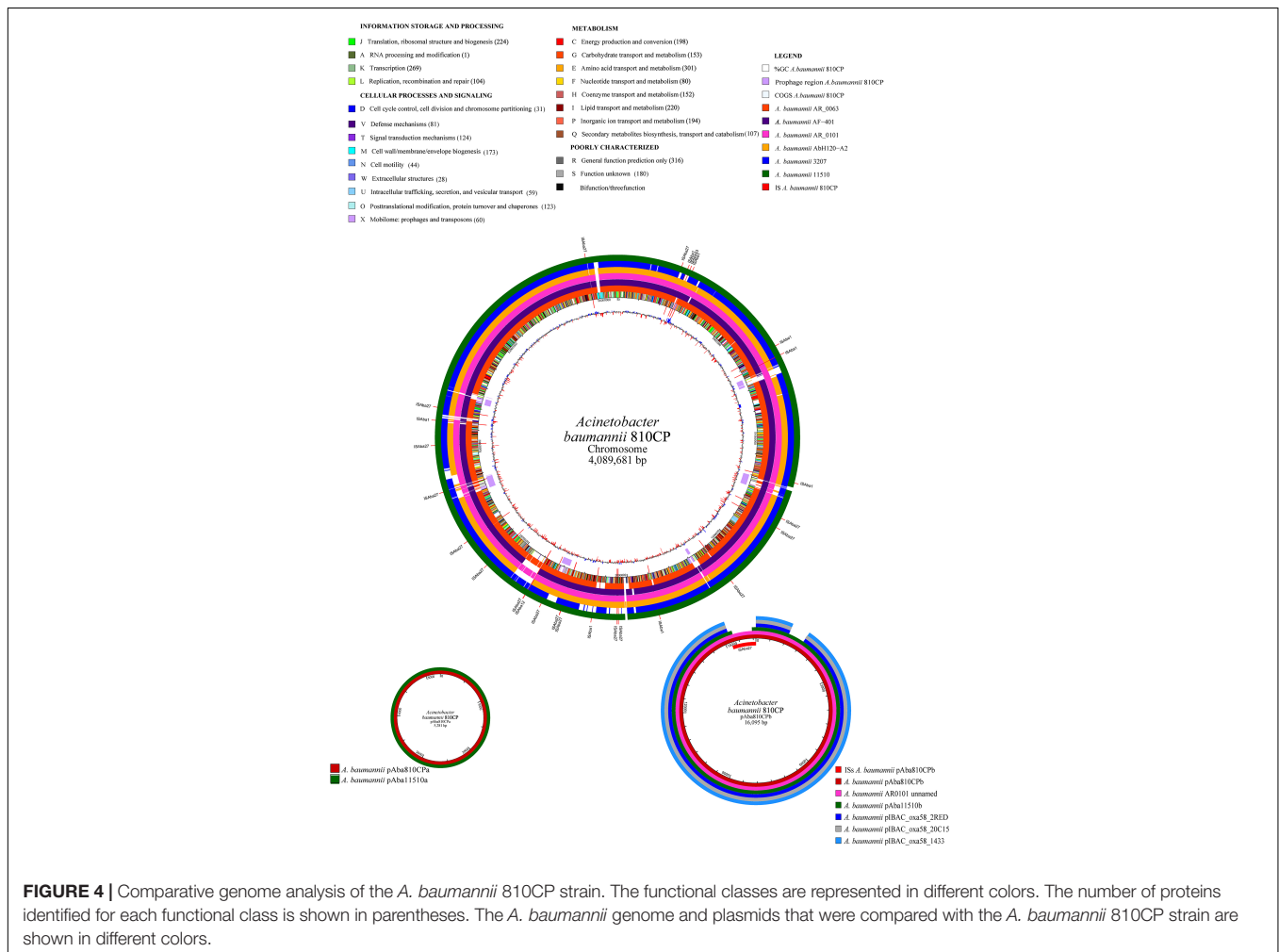
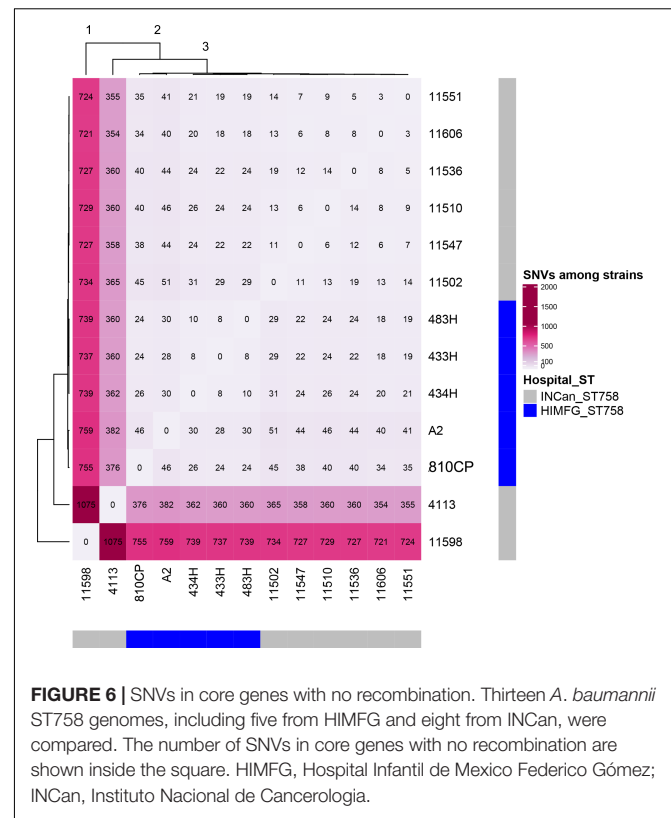
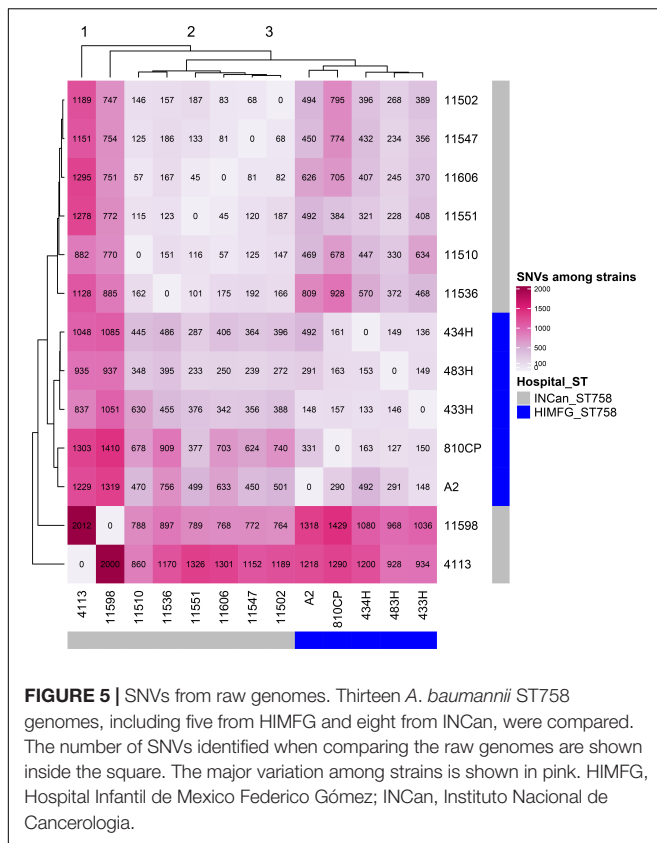


FIGURE 4 | Comparative genome analysis of the *A. baumannii* 810CP strain. The functional classes are represented in different colors. The number of proteins identified for each functional class is shown in parentheses. The *A. baumannii* genome and plasmids that were compared with the *A. baumannii* 810CP strain are shown in different colors.



of which encodes RepB, a protein containing a Rep_3 motif involved in plasmid replication (replicase). This plasmid also possesses genes involved in plasmid mobilization and those related to toxin–antitoxin (TA) systems, although antibiotic-resistance genes were not identified. The pAba810CPb plasmid has 18 predicted ORFs, 8 of which are annotated as hypothetical proteins. Similar to pAba810CPa, pAba810CPb has a TA system (Figure 4). Considering that this plasmid harbors a relaxase-encoding gene (*traA*), it is likely that pAba810CPb is a mobilizable plasmid. pAba810CPb does not encode genes involved in antibiotic resistance, and it contains an integrated ISAb27 element between a TonB-dependent receptor gene and a septicolysin gene. This plasmid also carries genes with a general classification: a CopG family transcriptional regulator, a DNA binding protein, and an acetyltransferase protein. A replicase gene was not identified, indicating that this plasmid has a novel replication system.

Comparative Genomics of *A. baumannii* ST758 Strains

The remaining four *A. baumannii* strains (433H, 434H, 483H, and A-2) isolated from same patient were sequenced using only an Illumina platform, and the resulting sequences of these isolates were compared. Analysis of the sequences showed that the strains are closely related but not identical. The five isolates have the same ST (ST758) and possess the same antibiotic resistant genes in the same relative positions. The number of SNVs observed in

the complete genomes varied between 127 and 492 (Figure 5), but when only the SNVs from the core genome without recombination signals were calculated, significantly fewer SNVs were identified, ranging from 8 and 30 (Figure 6). Strains 433H, 434H, and 483H varied by 8–10 SNVs, indicating that they are more closely related with each other than with strains A2 and 810CP. However, more dramatic differences were observed in gene content. The five strains have a pangenome of 3811 genes, but their core genome is made up of only 3613 genes. In other words, the non-core genome consists of 198 genes (Figure 7). This observation indicates that rapid gene turnover is crucial for generating genetic diversity in *A. baumannii*, as proposed by Graña-Miraglia et al. (2017). When the genome sequences of other ST758 strains isolated from a different Mexican tertiary care hospital (INCAn) were included in the analysis, the variation in SNVs in the complete genomes revealed that the strains 4113 and 11598 showed the greatest variation in the number of SNVs relative to the rest of the assayed strains. It has been proposed that these two strains are hypermutators, and they possess mutations in genes involved in DNA repair (Graña-Miraglia et al., 2017). Interestingly, all the strains isolated from the same patient were grouped together, while the other ST758 strains clustered into the other group (Figure 5, 6). When the gene content of all ST758 strains was analyzed, the number of genes included in the pangenome increased to 4010 genes, while the number of genes in the core genome decreased to 3422 genes (Figure 7). Subsequently, an analysis using BacWGSTdb showed that all of our strains had the same resistance genes and were

ST758. However, some variations were observed with respect to virulence genes. Around 80 virulence genes were present in most strains (**Supplementary Table 4**). However, the strains 810CP and 483H contain only 44 and 77 virulence genes, respectively. Interestingly, the virulence gene data set for the 810CP strain was identical to that of the 11510 strain (an ST758 isolate from INCan).

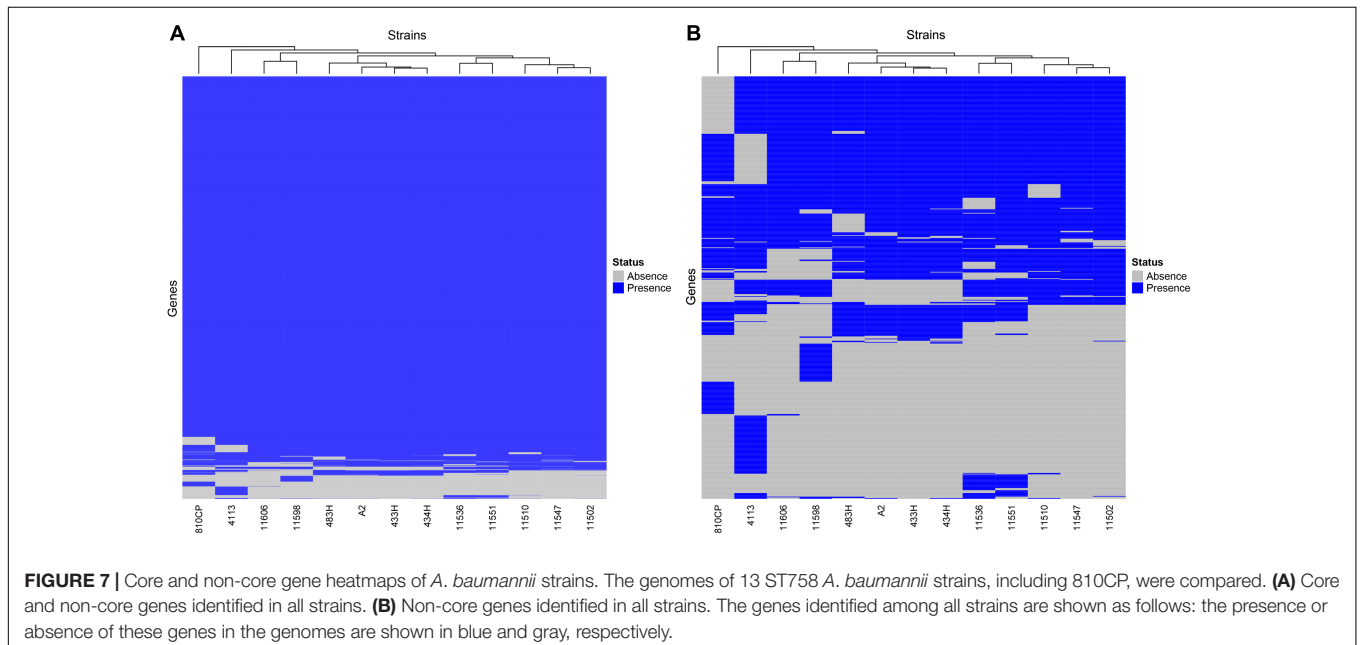
DISCUSSION

Acute leukemia is the most common cancer in children younger than 15 years old and has a wide-ranging incidence worldwide, with this disease being particularly prevalent in Hispanic residents in the United States and in Mexican children (Pérez-Saldivar et al., 2011; Metayer et al., 2013). *A. baumannii* is a major cause of morbidity and mortality due to the occurrence of new MDR clinical strains. The risk factors for *A. baumannii* infections, bacteremia, and colonization include severe underlying illness (particularly in critically ill patients and those with hematologic malignancy), prolonged antibiotic therapy with broad spectrum antibiotics, urinary tract infections and catheterization, respiratory tract colonization, infection and endotracheal intubation, and intestinal colonization (Cisneros et al., 1996; Maragakis and Perl, 2008). The overall mortality associated with *A. baumannii* bacteremia ranges between 25 and 54% and depends on the physical condition of the patient. Even in critically ill patients, some studies have shown that the contribution of MDR to *A. baumannii* bacteremia varies between 7.8 and 19%. Septic shock has been reported in up to 42% of patients with bacteremia and crude MDR in patients with bacteremia may reach 70%. However, complicated clinical courses and life-threatening complications are more likely to occur in

immunocompromised individuals (Cisneros et al., 1996; Maragakis and Perl, 2008).

Infections associated with carbapenem-resistant *A. baumannii* have been associated with high mortality rates, prolonged hospital stays, and increased health costs (Song et al., 2011; Lee et al., 2014). To nosocomial bacteria such as *A. baumannii* strains, an MDR profile confers a high probability of surviving in a hospital environment and is associated with hospital outbreaks (Cheng et al., 2015; Villalon et al., 2015). Our results characterized the *A. baumannii* strain 810CP as MDR, with the same MIC observed for imipenem and meropenem. Resistance to this antibiotic has increased in recent years worldwide, and in a tertiary care hospital in México, 89.2% of *A. baumannii* strains was observed to be resistant to imipenem (Rosales-Reyes et al., 2017), similar to reports in other countries (Liu et al., 2018).

In the 810CP genome, we identified the AdeFGH RND-efflux system, the overexpression of which confers MDR and the ability to pump antibiotics out of the cell. Furthermore, this system increases biofilm formation together with the overexpression of *adeG*, a component of this system (Coyne et al., 2010). Interestingly, the ISAbal element identified in the 810CP genome has been previously observed to be associated with the *strA* gene, the encoded product of which confers streptomycin resistance, and it is also involved in promoting ISAbal overexpression and bacterial susceptibility to these antibiotic classes (Corvec et al., 2003, 2007; Mugnier et al., 2009). The gene encoding the MdfA efflux pump was detected in the 810CP genome, the overexpression of which has been associated with resistance to several antibiotics, such as chloramphenicol and ciprofloxacin (Vila et al., 2007). Other important findings by our group include the identification of a 9996-bp resistance island that has recently been described in other *A. baumannii* strains [e.g., AR0101 (GenBank CP027611.1), 11510 (Graña-Miraglia et al., 2017),



AF401 (GenBank NZ_CP018254.1), AbH120-A2 (Merino et al., 2014), and AB030 (Loewen et al., 2014)].

The *bla*_{OXA-23} gene has been considered an important resistance biomarker and is located in either the plasmid or chromosome and is highly prevalent (Mugnier et al., 2010; Opazo et al., 2012; Evans and Amyes, 2014; Luo T.L. et al., 2015). MLST analyses have identified several clonal complexes, groupings of unique genotypes that share at least five loci, and these genotypes have diversified and increased their frequency in the population. For instance, the CC92B clonal complex, which is rarely observed in Latin American isolates but is prevalent in Asia and the United States, is found worldwide and includes carbapenem-resistant clones that harbor the *bla*_{OXA-23} gene encoding OXA-23, representing a risk of propagation of resistant clones (Ji et al., 2013; Wang et al., 2013; Gonzalez-Villoria et al., 2016). Some studies have described genes encoding OXAs that are located in plasmids. However, the *bla*_{OXA-23} gene described by our group was not identified in any of the plasmids studied; therefore, this OXA is encoded in the chromosome (Mugnier et al., 2010). Plasmid pAba810CPa, harboring the gene encoding RepB, contains identical characteristics to plasmid pAba11510a, which was described in another Mexican *A. baumannii* strain belonging to ST758 (Graña-Miraglia et al., 2017). The pAba810CPb plasmid identified in the 810CP strain has a TA system that can enhance the survival of bacterial cells during infection (Díaz-Orejas et al., 2017). Interestingly, genes encoding a TonB-dependent receptor and septicolysin are present in pAba810CPb adjacent to each other. However, many plasmids are not closely related to pAba810CPb, such as pAC12, pAC30a, pAC29a, pAB0057, p2ABYE, pMV01, and pAbaATCC233 (Lean et al., 2016).

In this study, similar PFGE and MLST profiles were obtained for the analyzed *A. baumannii* strains, and the genetic difference of a 388-kb fragment was identified only by PFGE analysis in the strains isolated from the bloodstream compared with the stool and autopsy strains (Tenover et al., 1995). Additionally, five ST758 strains identified by MLST sequencing of *bla*_{OXA-23} (data not shown) and WGS were primarily associated with the OXA-239 allele belonging to the OXA-23 group (Gonzalez-Villoria et al., 2016).

To establish if the five strains were closely related, a comparative genomic analysis was performed. The complete genome sequence of the 810CP strain was obtained using the Illumina and PacBio platforms, while the remaining four *A. baumannii* strains were sequenced only with the Illumina platform. An analysis using BacWGSTdb showed that all of our strains were ST758, as shown by the MLST analysis. Interestingly, ST758 belonging to CC636 corresponds to the Ibero American complex, which has been reported to be the most widespread in Europe, Asia, South Africa, and the United States (Tamayo-Legorreta et al., 2014; Lowings et al., 2015; Vanegas et al., 2015; Gonzalez-Villoria et al., 2016). In Colombia, CC636 has been considered a high-risk clone due to its frequent association with MDR *A. baumannii* strains, including carbapenem resistance (Correa et al., 2018).

Comparative genomic analysis was performed among 13 strains isolated from two Mexican hospitals (HIMFG and

INCAn), all belonging to ST758. The core genome of these strains consists in 34422 genes (86% of the pangenome). The SNVs analysis showed differences among the raw genomes and the genes that are not subject to recombination. Because recombination contributes changes in the genome, is better to use genes that are not subject to recombination to establish relationship among strains. In other bacteria, pairs of sequences varying by 2 SNVs were considered sufficiently closely related to be compatible with a recent direct transmission/acquisition from a common source. Pairs of sequences varying by 0–10 SNVs were considered related through a shared common ancestor sometime during or shortly before the study (~5 years evolution). Pairs of sequences varying by >10 SNVs were considered genetically distinct (Eyre et al., 2013). Interestingly, the amount of gene content variation in the *A. baumannii* strains was higher than the number of SNVs. These differences observed in our strains can be interpreted in two ways: first, all strains were genetically different, even if they had been isolated from the same patient, and in some cases from the same sample site, suggesting that the patient was infected by a number of distinct, but closely related strains. The other interpretation is that all genetic differences were acquired during the patient illness, indicating, as suggested by Graña-Miraglia et al. (2017), that the *A. baumannii* genome is highly dynamic and that gene turnover may have a crucial role shaping the genome of this microorganism. Additional studies must be performed to clarify this point.

The interface between *A. baumannii* and its environment is the cell envelope and includes the capsule. Genes involved in capsular biosynthesis were identified in our strains. *A. baumannii* cells possess a thick capsular polysaccharide to protect them from different external stresses, including desiccation and host defenses. *A. baumannii* strains lacking the capsule are non-virulent and are affected in biofilm formation (Lees-Miller et al., 2013). Genes involved in the synthesis of hepta-acylated LOS were identified in the genome. *A. baumannii* with LOS mutations are viable, but *in vitro*, they develop growth defects, resulting in severely diminished virulence (Beceiro et al., 2014; Powers and Trent, 2018). The five *A. baumannii* strains and the ATCC®19606TM strain with adhesion values to A549 cells ranged from 6.4×10^4 to 4.5×10^5 CFU/mL, similar to values reported in other studies (Eijkelkamp et al., 2011; Giannouli et al., 2013; Na et al., 2016; Ambrosi et al., 2017; Pérez et al., 2017). Sequencing of the whole genomes revealed genes involved in the biogenesis of the type IV pilus, which in Gram-negative bacteria, promotes adherence to human epithelial cells and the formation of microcolonies. However, the role of type IV pili in the *A. baumannii* remains to be investigated (Knutton et al., 1999; Barken et al., 2008; Saldaña-Ahuactzi et al., 2016).

Interestingly, the genes encoding BfmR/BfmS are also present in the genomes. The pili of *A. baumannii* are encoded by the *csuA/BABCDE* chaperone-usheer assembly system, which is controlled by a two-component regulatory system (BfmS and BfmR). This pilus has been associated with twitching-motility and biofilm formation by QS signaling molecules that enhance the expression of the chaperone-usheer secretion system (Luo L.M. et al., 2015). The five *A. baumannii* strains obtained from the child with leukemia M2 formed biofilms on polystyrene

surfaces when cultured in tryptone soy broth for 24 h at 37°C (data not shown). Biofilm formation and the acquisition of antibiotic-resistance genes in *A. baumannii* are properties that allow this pathogen to survive within a nosocomial environment (Roca et al., 2012). Mutations in the *bfnR*, *bfnS*, and *bap* genes result in decreased or disrupted biofilm formation, while the absence of the *bap* gene decreases adherence to human bronchial cells (Loehfelm et al., 2008; Tomaras et al., 2008; Brossard and Campagnari, 2012). The *pgaABCD* locus in *A. baumannii* encodes poly- β -1-6-*N*-acetylglucosamine, a molecule that plays a role in biofilm formation (Choi et al., 2009). In other pathogens, this molecule plays a major role in cell-to-surface and cell-to-cell adherence and protects cells against host defense mechanisms (Vuong et al., 2004; Sivaranjani et al., 2018). A mutation in the *abaI* gene that encodes the acyl-homoserine lactone autoinducer significantly affects biofilm formation and is favored following the addition of purified acyl-homoserine lactone or overexpression of the *abaI* gene (Bhargava et al., 2010).

Acinetobacter baumannii invades epithelial cells via a zipper-like mechanism, which is associated with microfilament and microtubule-dependent uptake mechanisms (Choi et al., 2008). Our data showed that epithelial cells derived from the respiratory tract were more susceptible to *A. baumannii* invasion than non-respiratory tract-derived epithelial cells. However, the strains analyzed in this study showed a low frequency of invasion compared with other invasive pathogens, such as *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, and *Cronobacter* species (Fleiszig et al., 1995; Huang et al., 1999; Cruz et al., 2011; Uliczka et al., 2011). Recently, OmpA and phosphorylcholine-porin D have been shown to be associated with cell adherence, invasion, and survival within pneumocytes (Mortensen and Skaar, 2012; Ambrosi et al., 2017).

The chromosomes of the assayed *A. baumannii* strains had five genes encoding phospholipases with the ability to hydrolyze phospholipids and contribute to pathogenesis, including the enzymatic activity that occurs during lysis of the host cell membrane (Antunes et al., 2011). These enzymes play a role in the infection and invasion of eukaryotic host cells (Stahl et al., 2015). Phospholipase C has been shown to play a role in virulence in several pathogens, including *A. baumannii*. Recently, phospholipase C in conjunction with elastase has been shown to enhance virulence in an insect model (Kareem et al., 2017).

In the *A. baumannii* genomes, two iron-uptake systems and a gene cluster involved in heme utilization were identified that are important for virulence, as demonstrated in other pathogens (Hom et al., 2013; Ou et al., 2015). Iron is a scarce element in the mammalian host, although it is essential for pathogen survival and infectivity. The systems involved in iron acquisition are very important for virulence. These systems are present in *A. baumannii* genomes and are essential for growth under iron-limiting laboratory conditions (Gaddy et al., 2012). The bioinformatics analysis of the genomes revealed that the TA systems that form a complex in which the antitoxin inhibits toxin activity are encoded by plasmids or chromosomes (Leplae et al., 2011). TA systems have been suggested to mediate bacterial persistence by generating slowly growing cells that are tolerant to antibiotics and environmental changes.

Moreover, these systems promote biofilm formation through programmed cell death (Yamaguchi and Inouye, 2009; Fair and Tor, 2014). At least five different TA systems have been identified based on the genomic sequencing of *A. baumannii* strains, including Sp1TA (DUF497/COG3514) (Fernández-García et al., 2016). Among a collection of *A. baumannii* clinical strains from Lithuanian hospitals (88.6% prevalence), HigB/HigAAb and Sp1TA TA systems were identified as the most abundant. These noncanonical TA systems are most prevalent in clinical *A. baumannii* strains belonging to the ECI and ECII lineages, which are widespread worldwide (Jurenaite et al., 2013). Among five strains, 810CP strain was the most different in relation to virulence genes, this could be associated to this origin, and that it was the first isolated from the child.

In summary, the patient described in this study was severely immunocompromised due to chemotherapy treatment and to the deterioration of health, increasing the risk of developing an infection by *A. baumannii*. According to molecular typing results, the strains showed identically PFGE and ST profiles. However, the results of genome sequencing determined that they were different strains with a closely related origin. The *A. baumannii* strains described in this study showed important characteristics meriting further investigation, such as with respect to pathway genomics, resistance, and surveillance of molecular epidemiology. The identified ST758 in the *A. baumannii* strains and the associated *bla*_{OXA-23} gene are considered genetic biomarkers that contribute to the persistence of these bacteria in the hospital environment. However, further assays are needed to determine whether these strains were endemic to our hospital or had evolved over time. Therefore, genetic studies are required to demonstrate the contribution of putative genes involved in the virulence of *A. baumannii*.

ETHICS STATEMENT

Research Committee (Dr. Juan Garduño Espinosa), Ethics Committee (Dr. Luis Jasso Gutiérrez), and Biosecurity Committee (Dr. Marcela Salazar García) of Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) granted the approval for the development of the protocol HIM/2017/003 SSA.1299. Written informed consent was not required for this study according to the institutional ethical, biosecurity, and investigation Committee due to Central Laboratory from HIMFG provided the *A. baumannii* clinical strains isolates from the child included in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC-C had the initial idea, which was developed into a project together with JX-C and JM-R. JM-R performed the experiments. AC-C, JX-C, MAC, SAO, VML-P, and JA-G analyzed the data. SC-J, MAC, and PB assembled, annotated, and performed bioinformatics analysis of genomes. AL-G reviewed and described the clinical case. MBdV supported the MLST sequencing. AC-C, JX-C, MAC, SAO, JA-G, MBdV, and RH-C contributed reagents and materials.

IP-O supplied the *A. baumannii* strains. AC-C, JX-C, and MAC wrote the manuscript, and read and approved the final version. All authors discussed and corrected the manuscript and approved it for publication.

FUNDING

JM-R received support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, PDCPN 605309. The data in this study are part of her master degree dissertation, in the Programa Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work was supported by Federal Funds HIM/2017/003 SSA.1299 at Hospital Infantil de México Federico Gómez, UNAM-DGAPA-PAPIIT grant IN200318 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) at Attention to National Problems under account number 1764.

REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Ambrosi, C., Scribano, D., Aleandri, M., Zagaglia, C., Di Francesco, L., Putignani, L., et al. (2017). *Acinetobacter baumannii* virulence traits: a comparative study of a novel sequence type with other Italian endemic international clones. *Front. Microbiol.* 12:1977. doi: 10.3389/fmicb.2017.01977
- Antunes, L. C., Imperi, F., Carattoli, A., and Visca, P. (2011). Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* 6:e22674. doi: 10.1371/journal.pone.0022674
- Arikawa, K., and Nishikawa, Y. (2010). Interleukin-8 induction due to diffusely adherent *Escherichia coli* possessing Afa/Dr genes depends on flagella and epithelial toll-like receptor 5. *Microbiol. Immunol.* 54, 491–501. doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00244.x
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., et al. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 10, 2331–2343. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x
- Bartual, S. G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M. A., Wisplinghoff, H., and Rodríguez-Valera, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4382–4390. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x
- Beceiro, A., Moreno, A., Fernández, N., Vallejo, J. A., Aranda, J., Adler, B., et al. (2014). Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 518–526. doi: 10.1128/AAC.01597-13
- Beres, S. B., Carroll, R. K., Shea, P. R., Sitkiewicz, I., Martínez-Gutiérrez, J. C., Low, D. E., et al. (2010). Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4371–4376. doi: 10.1073/pnas.0911295107
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Simon Fraser University Research Computing Group, Lau, B. Y., Hoad, G., et al. (2017). IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res.* 45, W30–W35. doi: 10.1093/nar/gkx343
- Bhargava, N., Sharma, P., and Capalash, N. (2010). Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 349–360. doi: 10.3109/1040841X.2010.512269
- Brossard, K. A., and Campagnari, A. A. (2012). The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect. Immun.* 80, 228–233. doi: 10.1128/IAI.05913-11
- Bruen, T. C., Philippe, H., and Bryant, D. (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172, 2665–2681. doi: 10.1534/genetics.105.048975

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Karina Espinosa Mazariego, Francisco Leal Vega, Estrella Tovar Calderón, Gerardo Escalona Venegas, Vicenta Cazares Domínguez, Isabel Franco Hernández, and Maria del Carmen Castellanos Cruz for their technical assistance. We thank Ricardo Grande and Gloria Tanahiry Vazquez Castro for the sequencing support as part of the Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UNAM).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00132/full#supplementary-material>

- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., et al. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 33, D325–D328.
- Cheng, A., Chuang, Y. C., Sun, H. Y., Sheng, W. H., Yang, C. J., Liao, C. H., et al. (2015). Excess mortality associated with colistin-tigecycline compared with colistin-carbapenem combination therapy for extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: a multicenter prospective observational Study. *Crit. Care Med.* 43, 1194–1204. doi: 10.1097/CCM.0000000000000933
- Choi, A. H., Slamti, L., Avci, F. Y., Pier, G. B., and Maira-Litrán, T. (2009). The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 191, 5953–5963. doi: 10.1128/JB.00647-09
- Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I., and Lee, J. C. (2008). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* 8:216. doi: 10.1186/1471-2180-8-216
- Cisneros, J. M., Reyes, M. J., Pachón, J., Becerril, B., Caballero, F. J., García-Garmendía, J. L., et al. (1996). Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin. Infect. Dis.* 22, 1026–1032. doi: 10.1093/clinids/22.6.1026
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100 (ISBN 1-56238-838-X [Electronic])*, 28th Edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Correa, A., Del Campo, R., Escandón-Vargas, K., Perenguez, M., Rodríguez-Baños, M., Hernández-Gómez, C., et al. (2018). Distinct genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Colombian Hospitals. *Microb. Drug Resist.* 24, 48–54. doi: 10.1089/mdr.2016.0190
- Corvec, S., Caroff, N., Espaze, E., Giraudeau, C., Drugeon, H., and Reynaud, A. (2003). AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 629–635. doi: 10.1093/jac/dkg407
- Corvec, S., Poirel, L., Naas, T., Drugeon, H., and Nordmann, P. (2007). Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1530–1533. doi: 10.1128/AAC.01132-06
- Coyne, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., and Périchon, B. (2010). Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4389–4393. doi: 10.1128/AAC.00155-10
- Cruz, A., Xicohtencatl-Cortes, J., González-Pedrajo, B., Bobadilla, M., Eslava, C., and Rosas, I. (2011). Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. *Can. J. Microbiol.* 57, 735–744. doi: 10.1139/w11-063
- Diancourt, L., Passet, V., Nemeč, A., Dijkshoorn, L., and Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5:e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034

- Díaz-Orejas, R., Espinosa, M., and Yeo, C. C. (2017). The importance of the expendable: toxin-antitoxin genes in plasmids and chromosomes. *Front. Microbiol.* 8:1479. doi: 10.3389/fmicb.2017.01479
- Dijkshoorn, L., Nemeč, A., and Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 939–951. doi: 10.1038/nrmicro1789
- Eijkkelkamp, B. A., Stroehrer, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., and Brown, M. H. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 323, 44–51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x
- Evans, B. A., and Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 241–263. doi: 10.1128/CMR.00117-13
- Eyre, D. W., Cule, M. L., Wilson, D. J., Griffiths, D., Vaughan, A., O'Connor, L., et al. (2013). Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N. Engl. J. Med.* 369, 1195–1205. doi: 10.1371/journal.pone.0182307
- Fair, R. J., and Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* 6, 25–64. doi: 10.4137/PMC.S14459
- Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T., et al. (2016). Toxin-Antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins* 8:E227. doi: 10.3390/toxins8070227
- Fitzpatrick, M. A., Ozer, E. A., and Hauser, A. R. (2016). Utility of whole-genome sequencing in characterizing *Acinetobacter* epidemiology and analyzing hospital outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 54, 593–612. doi: 10.1128/JCM.01818-15
- Fleiszig, S. M., Zaidi, T. S., and Pier, G. B. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* invasion of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 63, 4072–4077.
- Gaddy, J. A., Arivett, B. A., McConnell, M. J., López-Rojas, R., Pachón, J., and Actis, L. A. (2012). Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect. Immun.* 80, 1015–1024. doi: 10.1128/IAI.06279-11
- Gaynes, R., and Edwards, J. R. (2005). Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 41, 848–854. doi: 10.1086/432803
- Giannouli, M., Antunes, L. C., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P., and Zarrilli, R. (2013). Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect. Dis.* 13:282. doi: 10.1186/1471-2334-13-282
- Gonzalez-Villoria, A. M., Tamayo-Legorreta, E., Garza-Ramos, U., Barrios, H., Sanchez-Pérez, A., Rodríguez-Medina, N., et al. (2016). A Multicenter study in Mexico finds *Acinetobacter baumannii* clinical isolates belonging to clonal complexes 636B (113B) and 92B harboring OXA-72, OXA-239, and OXA-469. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2587–2588. doi: 10.1128/AAC.02042-15
- Graña-Miraglia, L., Lozano, L. F., Velázquez, C., Volkow-Fernández, P., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. A., et al. (2017). Rapid gene turnover as a significant source of genetic variation in a recently seeded population of a healthcare-associated pathogen. *Front. Microbiol.* 8:1817. doi: 10.3389/fmicb.2017.01817
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
- Higgins, P. G., Janßen, K., Fresen, M. M., Wisplinghoff, H., and Seifert, H. (2012). Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3493–3500. doi: 10.1128/JCM.01759-12
- Hom, K., Heinzl, G. A., Eakanunkul, S., Lopes, P. E., Xue, F., MacKerell, A. D., et al. (2013). Small molecule antivirulence targeting the iron-regulated heme oxygenase (HemO) of *P. aeruginosa*. *J. Med. Chem.* 56, 2097–2109. doi: 10.1021/jm301819k
- Huang, S. H., Chen, Y. H., Fu, Q., Stins, M., Wang, Y., Wass, C., et al. (1999). Identification and characterization of an invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* 67, 2103–2109.
- Hujer, K. M., Hujer, A. M., Hulten, E. A., Bajaksouzian, S., Adams, J. M., Donskey, C. J., et al. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 4114–4123. doi: 10.1128/AAC.00778-06
- Inns, T., Ashton, P. M., Herrera-Leon, S., Lighthill, J., Foulkes, S., Jombart, T., et al. (2017). Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of *Salmonella* enteritidis. *Epidemiol. Infect.* 145, 289–298. doi: 10.1017/S0950268816001941
- Ji, S., Chen, Y., Ruan, Z., Fu, Y., Ji, J., Wang, H., et al. (2013). Prevalence of carbapenem-hydrolyzing Class D β -lactamase genes in *Acinetobacter* spp. Isolates in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 989–997. doi: 10.1007/s10096-013-2037-z
- Jurenaite, M., Markuckas, A., and Suziedeliene, E. (2013). Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 195, 3165–3172. doi: 10.1128/JB.00237-13
- Kareem, S. M., Al-Kadmy, I. M. S., Al-Kaabi, M. H., Aziz, S. N., and Ahmad, M. (2017). *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced by the combined presence of virulence factors genes phospholipase C (*plcN*) and elastase (*lasB*). *Microb. Pathog.* 110, 568–572. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.001
- Knutton, S., Shaw, R. K., Anantha, R. P., Donnenberg, M. S., and Zorgani, A. A. (1999). The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol. Microbiol.* 33, 499–509. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01495.x
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., et al. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 5:R12. doi: 10.1186/gb-2004-5-2-r12
- Lean, S. S., Yeo, C. C., Suhaili, Z., and Thong, K. L. (2016). Comparative genomics of two ST 195 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with different susceptibility to polymyxin revealed underlying resistance mechanism. *Front. Microbiol.* 6:1445. doi: 10.3389/fmicb.2015.01445
- Lee, H. Y., Chen, C. L., Wu, S. R., Huang, C. W., and Chiu, C. H. (2014). Risk factors and outcome analysis of *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia in critical patients. *Crit. Care Med.* 42, 1081–1088. doi: 10.1097/CCM.0000000000000125
- Leekitcharoenphon, P., Nielsen, E. M., Kaas, R. S., Lund, O., and Aarestrup, F. M. (2014). Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One* 9:e87991. doi: 10.1371/journal.pone.0087991
- Lees-Miller, R. G., Iwashkiw, J. A., Scott, N. E., Seper, A., Vinogradov, E., Schild, S., et al. (2013). A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. *Mol. Microbiol.* 89, 816–830. doi: 10.1111/mmi.12300
- Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drèze, P., and Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res.* 39, 5513–5525. doi: 10.1093/nar/gkr131
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Liu, C., Chang, Y., Xu, Y., Luo, Y., Wu, L., Mei, Z., et al. (2018). Distribution of virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Oncotarget* 9, 21663–21673. doi: 10.18632/oncotarget.24651
- Loehfelm, T. W., Luke, N. R., and Campagnari, A. A. (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J. Bacteriol.* 190, 1036–1044. doi: 10.1128/JB.01416-07
- Loewen, P. C., Alsaadi, Y., Fernando, D., and Kumar, A. (2014). Genome sequence of an extremely drug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* strain AB030. *Genome Announc.* 2:e01035-14. doi: 10.1128/genomeA.01035-14
- Lowings, M., Ehlers, M. M., Dreyer, A. W., and Kock, M. M. (2015). High prevalence of oxacillinases in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from the Tshwane region, South Africa—an update. *BMC Infect. Dis.* 14:521. doi: 10.1186/s12879-015-1246-8
- Luo, L. M., Wu, L. J., Xiao, Y. L., Zhao, D., Chen, Z. X., Kang, M., et al. (2015). Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. *BMC Microbiol.* 7:62. doi: 10.1186/s12866-015-0397-5
- Luo, T. L., Rickard, A. H., Srinivasan, U., Kaye, K. S., and Foxman, B. (2015). Association of *blaOXA-23* and *bap* with the persistence of *Acinetobacter baumannii* within a major healthcare system. *Front. Microbiol.* 126:182. doi: 10.3389/fmicb.2015.00182

- Maragakis, L. L., and Perl, T. M. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1254–1263. doi: 10.1086/529198
- Merino, M., Alvarez-Fraga, L., Gómez, M. J., Aransay, A. M., Lavin, J. L., Chaves, F., et al. (2014). Complete genome sequence of the multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain AbH120-A2, isolated during a large outbreak in Spain. *Genome Announc.* 2:e01182-14. doi: 10.1128/genome.A01182-14
- Metayer, C., Milne, E., Clavel, J., Infante-Rivard, C., Petridou, E., Taylor, M., et al. (2013). The childhood leukemia international consortium. *Cancer Epidemiol.* 37, 336–347. doi: 10.1016/j.canep.2012.12.011
- Mortensen, B. L., and Skaar, E. P. (2012). Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. *Cell. Microbiol.* 14, 1336–1344. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01817
- Mugnier, P. D., Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010). Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 35–40. doi: 10.3201/eid1601.090852
- Mugnier, P. D., Poirel, L., and Nordmann, P. (2009). Functional analysis of insertion sequence ISAbal1, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 191, 2414–2418. doi: 10.1128/JB.01258-08
- Na, I. Y., Chung, E. S., Jung, C. Y., Kim, D. H., Shin, J., Kang, K., et al. (2016). Comparison of the virulence-associated phenotypes of five species of *Acinetobacter baumannii* complex. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 171–179. doi: 10.4014/jmb.1507.07076
- Opazo, A., Dominguez, M., Bello, H., Amyes, S. G., and Gonzalez-Rocha, G. (2012). OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J. Infect. Dev. Ctries.* 6, 311–316. doi: 10.3855/jidc.2310
- Ou, H. Y., Kuang, S. N., He, X., Molgora, B. M., Ewing, P. J., Deng, Z., et al. (2015). Complete genome sequence of hypervirulent and outbreak-associated *Acinetobacter baumannii* strain LAC-4: epidemiology, resistance genetic determinants and potential virulence factors. *Sci. Rep.* 5:8643. doi: 10.1038/srep08643
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., and Holden, M. T. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421
- Peleg, A. Y., Seifert, H., and Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 538–582. doi: 10.1128/CMR.00058-07
- Pérez, A., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Álvarez-Fraga, L., Vallejo, J. A., Beceiro, A., et al. (2017). The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH120-A2 strain. *Virulence* 8, 959–974. doi: 10.1080/21505594.2016.1262313
- Pérez-Saldivar, M. L., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Martínez-Avalos, A., Medina-Sanson, A., Espinosa-Hernández, L., et al. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 17:355. doi: 10.1186/1471-2407-11-355
- Powers, M. J., and Trent, M. S. (2018). Expanding the paradigm for the outer membrane: *Acinetobacter baumannii* in the absence of endotoxin. *Mol. Microbiol.* 107, 47–56. doi: 10.1111/mmi.13872
- Quinlan, A. R. (2014). BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 47, 11.12.1–11.12.34. doi: 10.1002/0471250953.bi1112s47
- Reuter, S., Ellington, M. J., Cartwright, E. J., Koser, C. U., Török, M. E., and Gouliouris, T. (2013). Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern. Med.* 173, 1397–1404. doi: 10.1001/jamainternmed.2013.7734
- Roca, I., Espinal, P., Vila-Farres, X., and Vila, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front. Microbiol.* 3:148. doi: 10.3389/fmicb.2012.00148
- Rosales-Reyes, R., Gayosso-Vázquez, C., Fernández-Vázquez, J. L., Jarillo-Quijada, M. D., Rivera-Benítez, C., Santos-Preciado, J. I., et al. (2017). Virulence profiles and innate immune responses against highly lethal, multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in Mexico. *PLoS One* 12:e0182899. doi: 10.1371/journal.pone.0182899
- Ruan, Z., and Feng, Y. (2016). BacWGSTdb, a database for genotyping and source tracking bacterial pathogens. *Nucleic Acids Res.* 44, D682–D687. doi: 10.1093/nar/gkv1004
- Saldaña-Ahuactzi, Z., Rodea, G. E., Cruz-Córdova, A., Rodríguez-Ramírez, V., Espinosa-Mazariego, K., González-Montalvo, M. A., et al. (2016). Effects of lng mutations on LngA expression, processing, and CS21 assembly in enterotoxigenic *Escherichia coli* E9034A. *Front. Microbiol.* 7:1201. doi: 10.3389/fmicb.2016.01201
- Seemann, T. (2014). Prokka; rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Siguié, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32–D36. doi: 10.1093/nar/gkj014
- Sivaranjani, M., Srinivasan, R., Aravindraj, C., Karutha Pandian, S., and Veera Ravi, A. (2018). Inhibitory effect of α -mangostin on *Acinetobacter baumannii* biofilms an in vitro study. *Biofouling* 34, 579–593. doi: 10.1080/08927014.2018.1473387
- Song, J. Y., Cheong, H. J., Choi, W. S., Heo, J. Y., Noh, J. Y., and Kim, W. J. (2011). Clinical and microbiological characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *J. Med. Microbiol.* 60, 605–611. doi: 10.1099/jmm.0.029439-0
- Stahl, J., Bergmann, H., Göttig, S., Ebersberger, L., and Averhoff, B. (2015). *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PLoS One* 10:e0138360. doi: 10.1371/journal.pone.0138360
- Tamayo-Legorreta, E. M., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Sanchez-Perez, A., Galicia-Paredes, A., Meza-Chavez, A., et al. (2014). Identification of OXA-23 carbapenemases: novel variant OXA-239 in *Acinetobacter baumannii* ST758 clinical isolates in Mexico. *New Microbes New Infect.* 2, 173–174. doi: 10.1002/nmi2.60
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A., and Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* 154(Pt 11), 3398–3409. doi: 10.1099/mic.0.2008/019471-0
- Tomaschek, F., Higgins, P. G., Stefanik, D., Wisplinghoff, H., and 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:e0153014. doi: 10.1371/journal.pone.0153014
- Uliczka, F., Pisano, F., Schaake, J., Stolz, T., Rohde, M., Fruth, A., et al. (2011). Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. *PLoS Pathog.* 7:e1002117. doi: 10.1371/journal.ppat.1002117
- Urwin, R., and Maiden, M. C. J. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 479–487. doi: 10.1016/j.tim.2003.08.006
- Vanegas, J. M., Higueta, L. F., Vargas, C. A., Cienfuegos, A. V., Rodríguez, É. A., Roncancio, G. E., et al. (2015). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* causing osteomyelitis and infections of skin and soft tissues in hospitals of Medellín, Colombia. *Biomedica* 35, 522–530. doi: 10.7705/biomedica.v35i4.2572
- Vila, J., Martí, S., and Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1210–1215. doi: 10.1093/jac/dkl509
- Villalon, P., Valdezate, S., Cabezas, T., Ortega, M., Garrido, N., Vindel, A., et al. (2015). Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC Microbiol.* 15:47. doi: 10.1186/s12866-015-0383-y
- Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., et al. (2004). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* 6, 269–275. doi: 10.1046/j.1462-5822.2004.00367.x
- Waack, S., Keller, O., Asper, R., Brodag, T., Damm, C., Fricke, W. F., et al. (2006). Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. *BMC Bioinformatics* 7:142. doi: 10.1186/1471-2105-7-142

- Wang, X., Qiao, F., Yu, R., Gao, Y., and Zong, Z. (2013). Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates revealed by a snapshot study. *BMC Microbiol.* 13:234. doi: 10.1186/1471-2180-13-234
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595
- Willems, S., Kampmeier, S., Bletz, S., Kossow, A., Köck, R., Kipp, F., et al. (2016). Whole-genome sequencing elucidates epidemiology of nosocomial clusters of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2391–2394. doi: 10.1128/JCM.00721-16
- Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2009). mRNA interferases, sequence-specific endoribonucleases from the toxin-antitoxin systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85, 467–500. doi: 10.1016/S0079-6603(08)00812-X
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261
- Zhang, Y. Y., Liang, Z. X., Li, C. S., Chang, Y., Ma, X. Q., Yu, L., et al. (2018). Whole-Genome analysis of an extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain XDR-BJ83: insights into the mechanisms of resistance of an ST368 strain from a Tertiary Care Hospital in China. *Microb. Drug Resist.* 24, 1259–1270. doi: 10.1089/mdr.2017.0246
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., and Wishart, D. S. (2011). PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 39, W347–W352. doi: 10.1093/nar/gkr485
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2019 Mancilla-Rojano, Castro-Jaimes, Ochoa, Bobadilla del Valle, Luna-Pineda, Bustos, Laris-González, Arellano-Galindo, Parra-Ortega, Hernández-Castro, Cevallos, Xicohtencatl-Cortes and Cruz-Córdova. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

