



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Identificación de proteínas inmunogénicas de *Acinetobacter baumannii* con enfoque inmunoproteómico”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Licenciada en Microbiología Minerva Estrada Nieves

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez

Querétaro, Qro. a mayo 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Identificación de proteínas inmunogénicas de *Acinetobacter baumannii* con enfoque inmunoproteómico”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Química
Clínica

Presenta

Licenciada en Microbiología Minerva Estrada Nieves

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez
Presidente

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Sinodal

Dra. María Carlota García Gutiérrez
Sinodal

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano
Sinodal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Mayo 2022
México

DEDICATORIA

A mi directora de tesis, la Doctora Bertha Isabel Carvajal, quien me guio, apoyo e impulso durante el desarrollo del proyecto. Es una de las personas que más me inspiro a seguir este camino como profesionista.

A mi familia, mis padres Claudia Nieves y José Antonio Estrada Cervantes, los cuales son mi principal motivación e inspiración, que me enseñaron a seguir y cumplir todos mis sueños como profesionista. A mis hermanos, Sofía, Elena y José Antonio, quienes me han brindado su apoyo siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Claudia, José Antonio, mis hermanos Sofía, Elena y José por su por su incondicional apoyo y cariño a lo largo de mi vida.

A Conacyt por brindar los recursos durante toda la maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, mi máxima casa de estudios desde mi educación media superior, Licenciatura y Maestría.

A mi directora de tesis, la Doctora Bertha Carvajal, por abrirme las puertas y permitirme formar parte de su equipo de investigación.

A todos los miembros de mi comité, la Doctora Angelina quien fue parte importante durante mi educación en la licenciatura y en la maestría, quien es una de las personas que más me inspira en el área académica y personal. A la Doctora Carlota por su apoyo, asesoramiento y colaboración durante este proyecto. A la Doctora Rosa Martha quien me permitió trabajar en su laboratorio y el acceso a sus equipos. A la Doctora Gabriela Aguilar quien me brindo su conocimiento y asesoría durante la maestría. Al maestro Luis Enrique Becerril por facilitar la colaboración con el hospital Ramón de la Fuente Muños para la obtención de muestras. Al Doctor Juan Joel Gualito por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme, asesoría y parte de su tiempo.

A todas las personas que forman parte del Laboratorio de Inmunología y Vacunas, en especial al Doctor Diego, el maestro Miguel, Susana Mejía, Karen Juárez y Andrés quienes me asesoraron y me brindaron parte de su tiempo y conocimiento.

A mis mejores amigos Brenda, Karen, Diana, Romina, Ana y Neto por su apoyo, amistad y cariño todos estos años y principalmente por hacer de mi vida un camino más divertido.

Índice general

1. Resumen	1
1.1 Abstract	2
1.2 Declaracion de responsabilidad de estudiante	3
2. Introducción	4
3. Antecedentes	8
3.1 Microbiología de <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
3.1.1 Taxonomía.	9
3.1.2 Métodos de identificación	10
3.1.2.1 Identificación fenotípica	10
3.1.2.2 Identificación genotípica	11
3.2 Epidemiología	12
3.2.1 Reservorios hospitalarios	15
3.3 Resistencia a múltiples fármaco s.	16
3.3.1 β Lactamasas	16
3.3.2 Cambios en la permeabilidad	18
3.4 Factores de Virulencia	20
3.4.1 Porinas	22
3.4.2 LPS	23
3.4.3 Vesículas de la membrana externa	25
3.4.4 Sistema de adquisición a metales	25
3.4.5 Sistema de secreción de proteínas	26
3.4.6 Proteínas de unión a penicilina y β -lactamasas PER-1	27
3.4.7 Fosfolipasas	27
3.4.8 Biopelículas	28
3.4.9 Adhesinas	28

3.5	Respuesta inmune innata a la infección	30
3.6	Evacion de la respuesta inmune	32
3.7	Coinfecciones asociadas a covid-19	35
3.8	Inmunoproteómica en la detección de candidatos vacúnales	36
3.8.1	Biomarcadores en <i>Acinetobacter baumannii</i>	37
3.9	Candidatos Vacúnales	38
4.	Hipótesis	42
5.	Objetivos	43
5.1	Objetivo general	43
5.2	Objetivos específicos	43
6.	Metodología	44
6.1	Diseño experimental	44
6.1.2	Muestras	44
6.2	Extracción de proteínas.	45
6.3	Cuantificación de proteínas por Bradford	46
6.4	Integridad gel 1 D SDS-PAGE	46
6.5	Electroforesis 2D	47
6.6	Inmunotransferencia.	48
6.7	Detección de anticuerpos contra <i>A. bauamannii</i>	48
6.8	Inmunotransferencia	48
6.9	Caracterización de proteínas	49
7	Resultados	50
7.1	Características de las cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	50
7.2	Cuantificación de proteínas por el metodo de Bardford	53
7.3	Integridad de protenas	55
7.4	Proteoma de <i>Acinetobacter baumannii</i>	57
7.5	Inmunodeteccion de proteinas por <i>A. bauamannii</i> probados en sueros expuestos.	61
7.6	Inmunoproteóma de <i>Acinetobacter bauamnii</i>	70

7.7	Análisis <i>in-silico</i> de proteínas inmunogénicas	73
7.8	Predicción de epítopos de las proteínas detectadas	76
7.9	Análisis de estructura de proteínas	90
8.	Discusión	94
9.	Conclusión	102
10.	Referencias	103

Índice de Figuras.

Figura 1:	Infecciones causadas por especies de <i>Acinetobacter</i>	1
Figura 2:	Distribución de <i>A. baumannii</i> resistente a carbapenémicos.	14
Figura 3:	Producción de toxinas	24
Figura 4:	Internalización de <i>A. baumannii</i> en células epiteliales	29
Figura 5:	Respuesta inmune innata a la infección por <i>A. baumannii</i>	31
Figura 6:	Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por <i>A. baumannii</i>	33
Figura 7:	Curva estándar para la cuantificación de proteínas de Ab1 y 2	53
Figura 8:	Análisis de integridad de las muestras Ab 56, 61, 60, 1 y 2.	55
Figura 9:	Análisis de integridad y cuantificación de la cepa ATCC	56
Figura 10:	Gel 2D de <i>A. baumannii</i>	57
Figura 11:	Análisis proteómico de <i>Acinetobacter baumannii</i>	59
Figura 12:	Detección de anticuerpos contra <i>A. baumannii</i> por Western blot.	62
Figura 13:	Detección de anticuerpos contra la cepa <i>A. baumannii</i> 60 por Western blot	63
Figura 14:	Frecuencia de proteínas inmunogénicas.	70

Figura 15: Inmunoproteóma de <i>Acinetobacter baumannii</i> cepa 1	71
Figura 16: Inmunoproteóma de <i>Acinetobacter baumannii</i> cepa 60.	72
Figura 17: Estructura 3D de proteínas inmunogénicas	92
Figura 18: Gráfica de las regiones de epítomos	93

Índice de Tablas.

Tabla 1: β -Lactamases reportadas en <i>A. baumannii</i>	17
Tabla 2: Bombas de eflujo reportadas en <i>A. baumannii</i>	19
Tabla 3: Factores de virulencia reportados en <i>A. baumannii</i>	21
Tabla 4: Candidatos vacúnales contra <i>A. baumannii</i>	41
Tabla 5: Características de las cepas de <i>A. baumannii</i>	51
Tabla 6: Concentración de las muestras de proteínas	54
Tabla 7: Análisis <i>in silico</i> de proteínas inmunogénicas.	74
Tabla 8: Epítomos B identificados en OmpA por ABCpred.	78
Tabla 9: Epítomos B identificados en Oxa-23 por ABCpred.	79
Tabla 10: Epítomos B identificados en OprF por ABCpred.	79
Tabla 11: Epítomos B identificados en FilF por ABCpred.	80
Tabla 12: Epítomos B identificados en BamA por ABCpred.	81
Tabla 13: Epítomos B identificados en Bpl1 por ABCpred.	83
Tabla 14: Epítomos B identificados en MotB por ABCpred.	88
Tabla 15: Epítomos B identificados en OprC por ABCpred.	89

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BGN	Bacilos Gram Negativas.
BLEE	β-lactamasas de espectro extendido
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> Resistente a Carbapenem
DHFR	Dihidrofolato Reductasas
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
LPS	Lipopolisacáridos
MAC	Complejo de membrana externa
MALDI-TOF	Espectrometría de masas por ionización con láser asistida por matriz
MBL	Metalo-β-lactamasa
MDR	Resistencia a Múltiples Fármacos
OMP	Proteínas de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMV	Vesículas de membrana externa
PBP	Proteínas de unión a la penicilina
PCL	Fosfolipasas

PCR-ESI-MS	PCR-espectrometría de masas de ionización por electropulverización
RV	Vacunación inversa
T2SS	Sistema de secreción tipo 2
T6SS	Sistema de secreción tipo 6
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VaC	Candidatos vacúnales
ViF	Factores de virulencia
XDR	Resistencia Farmacológica Extensa

1 Resumen

Acinetobacter baumannii es un agente patógeno causante de infecciones asociadas a la atención de la salud, más relevante de los últimos años. Lo anterior se debe a la presencia de cepas altamente resistentes. En México los sistemas de vigilancia epidemiológica reportaron brotes de *A. baumannii* multirresistente en hospitales de todo el país desde el 2015. Las coinfecciones asociadas al nuevo coronavirus SARS-CoV-2 se han convertido en un tema de interés médico, estudios recientes demostraron que en algunos hospitales se reportó una coinfección con *A. baumannii* de hasta el 90% de los pacientes hospitalizados. En la actualidad los posibles tratamientos antimicrobianos contra *A. baumannii*, presentan limitantes que interfieren con el control de los brotes debido a la prevalencia de cepas multirresistentes. El diseño de vacunas representa una estrategia preventiva eficaz contra enfermedades infecciosas. Por lo anterior, la identificación de péptidos y proteínas inmunogénicas contribuirán a identificar candidatos a vacuna para el control y prevención de infecciones contagiosas. El análisis inmunoproteómico, permite identificar la expresión diferencial de proteínas implicadas en los procesos de invasión las cuales representan candidatos a vacuna importantes. El objetivo de este estudio fue detectar proteínas inmunogénicas expresadas en *A. baumannii* con sueros de voluntarios expuestos a la infección a través de un enfoque inmunoproteómico. El Proteoma se obtuvo utilizando cepas de *A. baumannii* multirresistentes, posteriormente las proteínas fueron separadas por electroforesis 2D. La identificación de proteínas inmunogénicas se realizó utilizando muestras de sueros de voluntarios ingresados a la UCI con cuadro clínico respiratorio y una posible coinfección con *A. baumannii*, la cual se determinó y comprobó a partir de la detección de anticuerpos por western blot. La detección de proteínas inmunogénicas se evaluó por Western blot. Las proteínas se identificaron teóricamente por un análisis comparativo bibliográfico de acuerdo al punto isoelectrico y talla molecular. Un total de 15 spots fueron detectados, de los cuales 8 fueron identificados teóricamente, se sugiere, de acuerdo a nuestro análisis que estas proteínas corresponden a: OmpA, MotB, Oxa-23, OprF, BilF, Blp1, OprC y

BamA. Por último, la caracterización de proteínas y mapeo de epitopos fue realizada para evaluar su potencial como candidatos a vacuna. Para comprobar la identificación teórica de proteínas realizada en este estudio, será necesario la identificación por MALDI-TOF, trabajos en progreso.

Palabras clave: *A. baumannii*, Multirresistencia, Coinfección, Inmunoproteómica, Candidatos a vacuna.

1.1 Abstract

Acinetobacter baumannii is a pathogenic agent that causes infections associated with health care, more relevant in recent years. This is due to the presence of highly resistant strains. In Mexico, systems of epidemiological surveillance have reported outbreaks of multi-resistant *A. baumannii* in hospitals throughout the country since 2015. Coinfections associated with the new SARS-CoV-2 coronavirus have become a topic of medical interest; recent studies have shown that in some Hospitals, coinfection with *A. baumannii* was reported in up to 90% of hospitalized patients. Currently, the possible antimicrobial treatments against *A. baumannii* have limitations that interfere with the control of outbreaks due to the prevalence of multiresistant strains. Vaccine design represents an effective preventive strategy against infectious diseases. Therefore, the identification of peptides and immunogenic proteins will contribute to identifying vaccine candidates for the control and prevention of contagious infections. Immunoproteomic analysis makes it possible to identify the differential expression of proteins involved in invasion processes, which represent important vaccine candidates. The objective of this study was to detect immunogenic proteins expressed in *A. baumannii* with sera from volunteer studies exposed to infection through an immunoproteomic approach. The proteome was obtained using multiresistant *A. baumannii* strains, then the proteins were separated by 2D electrophoresis. The identification of immunogenic proteins was carried out using serum samples from volunteers admitted to the ICU with

respiratory symptoms and a possible co-infection with *A. baumannii*, which was determined and verified from antibody detection of western blot assays. Detection of immunogenic proteins was assessed by Western blot. The proteins were theoretically identified by comparative literature analysis according to isoelectric point and molecular size. A total of 15 spots were detected, of which 8 were theoretically identified. It is suggested, according to our analysis, that these proteins correspond to: OmpA, MotB, Oxa-23, OprF, BilF, Blp1, OprC and BamA. Finally, protein characterization and epitopes mapping were performed to evaluate their potential as vaccine candidates. To verify the theoretical identification of proteins carried out in this study, identification by MALDI-TOF is necessary, work in progress will be.

Keywords: *A. baumannii*, Multiresistant, Coinfections, Immunoproteomic, Vaccine candidates.

1.2 DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reportó detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

2 Introducción

En los últimos años las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* se han convertido en un problema grave de salud emergente en los hospitales de todo el mundo, generando un aumento en la tasa de morbilidad y mortalidad hospitalaria (Harding *et al.*, 2018).

A. baumannii es un patógeno bacteriano oportunista con estructura cocobacilo, clasificada como bacteria Gram-negativa, responsable de causar una amplia gama de infecciones. Con mayor frecuencia, las infecciones por *A. baumannii* se manifiestan como neumonía asociada a ventilación mecánica o infecciones del torrente sanguíneo de la vía central, aunque también son responsables de causar meningitis, infecciones en la piel y heridas quirúrgicas e infección del tracto urinario (Shiralizadeh S *et al.*, 2018)

La CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades) clasificó en 2016 a *A. baumannii* resistente a múltiples fármacos (MDR) como una amenaza grave, además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2007, ha incluido a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos como patógeno de prioridad crítica en la lista de bacterias que representan la mayor amenaza para la salud humana, priorizando los esfuerzos de investigación y desarrollo para nuevos tratamientos antimicrobianos.

A. baumannii se ha relacionado en los últimos años como uno de los patógenos más importante de infecciones asociadas a la atención sanitaria IAAS (Pleșca CE *et al.*, 2015). La mayoría de la infección por *A. baumannii* son adquiridas en los hospitales, ocurriendo con mayor frecuencia en pacientes críticos en el entorno de la unidad de cuidados intensivos (UCI) donde representan hasta el 20% de las infecciones en todo el mundo (Vincent *et al.*, 2009), la tasa de mortalidad de esta bacteria alcanza el 60% en pacientes vulnerables (Zahedi B *et al.*, 2015), sin embargo, las infecciones adquiridas en los hospitales no representan la única forma de infección, se ha reportado un aumento gradual de infecciones adquiridas en la comunidad (Lin y Lan *et al.*, 2014).

Las coinfecciones asociadas al nuevo coronavirus conocido SARS-CoV-2 (síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2) se han convertido en un tema de interés médico, actualmente se han publicado pocos estudios relacionados a estas asociaciones. El equipo de respiración asistida que se requiere para tratar pacientes con Covid-19 representa una fuente de posible contaminación bacteriana. En la investigación realizada por Sharifipour se evaluaron las coinfecciones bacterianas del tracto respiratorio en pacientes ingresados a la UCI por COVID-19, en este estudio se realizaron determinaciones bacterianas y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, los resultados arrojaron que el 90% de los pacientes mantenía una coinfección con *A. baumannii*, donde se reportaron 17 cepas multirresistentes, al final del estudio estos pacientes no sobrevivieron, este aumento en la mortalidad podría estar asociado a la coinfección bacteria – virus, sin embargo, aún faltan más estudios que lo confirmen (Sharifipour *et al.*, 2020).

El uso de análisis genómicos y fenotípicos han permitido la identificación de factores de virulencia responsables de su patogenicidad, que incluyen porinas de membrana externa, fosfolipasas, proteasas, lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares, sistemas de secreción de proteínas y sistemas quelantes de hierro (McConnell *et al.*, 2013). Aunque en comparación con otros patógenos Gram-negativos, se han identificado relativamente pocos factores de virulencia en *A. baumannii* (Harding *et al.*, 2018).

La relevancia clínica de este patógeno, se debe a su alta capacidad para adquirir resistencia a múltiples fármacos, incluidos antibióticos de nueva generación. La resistencia a los carbapenémicos que muestran los aislados de *A. baumannii* ha aumentado en los últimos años debido a la diseminación de clones específicos (Viehman *et al.*, 2014). Esta alta capacidad de generar resistencia a los carbapenémicos, antibiótico de alto espectro que se considera como tratamiento eficaz frente a infecciones por patógenos multirresistente, la posicionan como uno de los patógenos nosocomiales de mayor relevancia clínica. (Coyle *et al.*, 2014). La red internacional para el estudio y prevención de la resistencia antimicrobiana

emergente, definió el surgimiento de la resistencia a los carbapenémicos en las infecciones por *A. baumannii* como un "evento centinela global" que garantiza intervenciones epidemiológicas y microbiológicas rápidas (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

A. baumannii cuenta con diferentes mecanismos que le permiten adquirir resistencia, entre los cuales se encuentran la degradación enzimática de fármacos por β lactamasas, bombas de eflujo (Abdi S *et al.*, 2020) y defectos de permeabilidad (Nowak P *et al.*, 2016).

La emergente aparición de cepas de *A. baumannii* multirresistentes, enfatiza la urgencia de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento que no sea el uso de antibióticos, una de las alternativas es el desarrollo de vacunas (Harding *et al.*, 2018). Recientemente se han propuesto candidatos a vacuna enfocados a partir del diseño de células completas atenuadas, fantasmas bacterianos compuestos únicamente por la envoltura extracelular, ADN y proteínas de la membrana extracelular (Cabral MP *et al.*, 2017)

Aunque el uso de vacunas diseñadas con el patógeno vivo atenuado muestra respuestas inmunogénicas elevadas, representan un mayor riesgo para la salud debido a que las mutaciones pueden revertir el estado de virulencia y conducir nuevamente al estado virulento, los fantasmas bacterianos también han mostrado riesgo por inflamación excesiva causado por la presencia de lipopolisacáridos nativos (Tabrizi CA *et al.*, 2004), por otra parte, las vacunas diseñadas a partir de ADN muestran respuestas inmunogénicas retrasadas y menos potentes. Por lo que el uso de vacunas a base de péptidos y proteínas inmunogénicas representan una estrategia más segura y eficaces para el control y prevención de la enfermedad.

Estas proteínas son capaces de inducir la producción de anticuerpos y activar la respuesta inmune contra la infección (Chiang *et al.*, 2015). Sin embargo, por si solas no son capaces de activar respuestas inmunológicas tan elevadas. La construcción de proteínas quiméricas o el uso combinado de diferentes proteínas inmunogénicas en una sola vacuna aumenta estas respuestas, por lo que se requiere la

identificación masiva de grandes paneles de proteínas inmunogénicas que puedan ser usadas como candidatos vacúnales (Sheweita *et al.*, 2019).

La inmunoproteómica supone una estrategia eficaz para la detección de grandes paneles de proteínas inmunogénicas, es decir proteínas que interactúan directamente con el sistema inmunológico y que por lo tanto son proteínas candidatos a vacuna (Gang Li *et al.*, 2017). El inmunoma del patógeno, consiste en el segmento del proteoma que actúa como diana del sistema inmunitario, la caracterización del inmunoma de *A. baumannii* permite identificar candidatos vacúnales, así como la detección de posibles dianas terapéuticas.

El análisis de suero de voluntarios con posible exposición a la infección por *A. baumannii*, permite examinar, global y simultáneamente, los perfiles de reactividad de los anticuerpos séricos dirigidos frente a un amplio espectro de antígenos, muchos de los cuales tienen una notable significación clínica y/o terapéutica. Por lo tanto, la finalidad del proyecto es identificar y caracterizar proteínas inmunogénicas como posibles candidatos vacúnales expresadas por *A. baumannii* para reducir los brotes hospitalarios.

3 Antecedentes

3.1 Microbiología de *Acinetobacter baumannii*

El género *Acinetobacter*, como se define actualmente, comprende varias especies bacterianas que muestran morfología cocobacilar, presentan una doble membrana celular que les permite clasificarse como Gram negativas, algunas características fenotípicas que muestran sus cultivos como: catalasas positivas, oxidasa negativa, no fermentativas, no móviles y aerobios estrictos pueden atribuirse al género, sin embargo, algunas especies muestran pequeñas diferencias. Esta estrecha relación que comparten las especies dificulta su caracterización a través de métodos quimio taxonómicos, sin embargo, actualmente son bien reconocidas por la relevancia clínica y la resistencia antimicrobiana. Se estima que más del 90% de la infección causada por *Acinetobacter* corresponde a la especie *A. baumannii* (Figura 1), siendo la especie de mayor relevancia clínica (Harding *et al.*, 2018). *A. baumannii* muestra buen crecimiento en todos los medios de cultivo de rutina, con una temperatura óptima entre 33 a 35° C. Los miembros de género *Acinetobacter* eran considerados como microorganismos sin relevancia clínica, ubicuos en la naturaleza. Su hábitat natural es el suelo y el agua, aunque ha sido aislado de alimentos, artrópodos y es encontrado comúnmente en el ambiente. En cuanto a sus características genotípicas encontramos un contenido de ADN G + C de 39% a 47% (Antunes *et al.*, 2014; McConnell *et al.*, 2013).

Figura 1: Infecciones causadas por especies de *Acinetobacter*

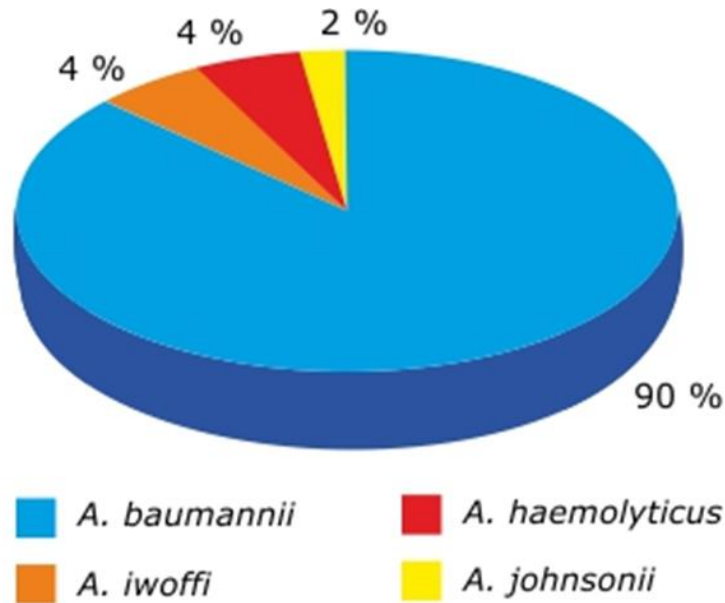


Figura 1: Análisis del porcentaje de infecciones causadas por especies de *Acinetobacter*. (Harding *et al.*, 2018)

3.1.1 Taxonomía

El género *Acinetobacter* ha sufrido diversas modificaciones taxonómicas a lo largo de la historia, lo que representa un obstáculo para su estudio. En 1911 el microbiólogo holandés, Beijerinck, designa el nombre de *Micrococcus calcoaceticu*. En 1954, Brisou y Prévost nombran a la especie como *Acinetobacter*, atribuyendo su característica fenotípica como bacteria no móvil (Touchon M. *et al.*, 2014). En 1971 la taxonomía sufre otras atribuciones, se reconoce oficialmente el género *Acinetobacter* por el subcomité de taxonomía de bacterias *Moraxella*, más tarde en 1974, Manual Bergey contribuye con la aparición del termino *Acinetobacter calcoaceticus* (Cosgaya C. *et al.*, 2016).

Los datos taxonómicos recientes, proponen que los miembros del género *Acinetobacter*, que comprende bacterias Gram-negativas, se clasifiquen en la nueva

familia de *Moraxellacea* dentro del orden *Gammaproteobacteria*, que incluye los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y otros organismos relacionados (Bouvent P.J. *et al.*, 1987). La última definición taxonómica de *Acinetobacter* corresponde a Bouvet y Grimont, quienes plantean 12 genoespecies diferentes, entre las más relevantes encontramos: *A. baumannii*, *A. iwoffii*, *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. haemolyticus*, entre otras. Más tarde se descubrieron otras especies genómicas que resultaron ser sinónimas de algunas especies descritas por Bouvet (Bouvent P.J. *et al.*, 1987). Recientemente se describieron más especies de *Acinetobacter* incluidas 3 especies de origen humano; *A. parvus*, *A. schindleri* y *A. ursingii* y otras 7 especies aisladas de lodos activados utilizados para el tratamiento de aguas residuales, incluyendo; *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* y *A. gernerii*, obteniendo 31 especies genómicas válidamente descritas de las cuales 17 tienen nombre designado válido.

A. calcoaceticus, *A. baumannii*, *Acinetobacter 3* y *Acinetobacter 13TU* muestran propiedades fenotípicas parecidas por lo que es difícil su diferenciación, Sin embargo, *A. baumannii* es la especie reconocida con mayor frecuencia y solo puede ser diferenciada de las demás especies genómicas del complejo por métodos genotípicos (Gener-Smidt P. *et al.*, 1991).

3.1.2 Métodos de identificación

3.1.2.1 Identificación Fenotípica

La identificación fenotípica de *Acinetobacter* sp. a nivel de género, muestra una morfología cocobacilar, Gram-negativo, no fermentador de glucosa, oxidasa negativa, catalasa positivo e inmóvil.

Acinetobacter se aísla con facilidad en cultivos habituales, aunque muestra baja reacción en las determinantes bioquímicas más comunes usadas para diferenciar entre bacilos gram negativos (BGN), en las pruebas de antibiograma muestran crecimiento retrasado, tiempo de diagnóstico esencial para pacientes infectados.

Las especies de *Acinetobacter* pueden crecer en medios de cultivo como Columbia agar sangre, agar de soya tríptico bajo condiciones de aerobiosis y temperatura de 37°C. En estos medios forman colonias lisas, mucosas, de color blanco grisáceo.

El aislamiento de muestras con microbiota polimicrobiana que usan los programas de vigilancia epidemiológica nosocomial es en el medio Leeds *Acinetobacter*, que permite el aislamiento en poblaciones bacterianas mixtas (McConnell MJ. *et al.*, 2011).

La identificación fenotípica a nivel especie, a partir de los métodos comerciales que usan actualmente en el laboratorio de microbiología clínica, como API 20NE y los analizadores automáticos Vitek 2, Phoenix y el sistema MicroScan Walkaway, no permiten la distinción entre especies (Peleg AY. *et al.*, 2008).

Las especies que aparecen con mayor frecuencia en la literatura científica, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* y *A. Iwoffii*, muestran dificultad para su diferenciación fenotípica, por lo que se acuñó el término “complejo *A. calcoaceticus*- *A. baumannii*”. En la actualidad se considera de importancia la diferenciación de este complejo debido a que *A. baumannii* y *A. pittii* producen infecciones graves. Bouvet y Grimont diseñaron un esquema de identificación de especies (Bouvet PJ. *et al.*, 1986), el cual fue modificado por Gener-Smidt y otros. Este esquema se basa en la respuesta diferenciada a reacciones bioquímicas y el uso de diferentes temperaturas de incubación (Gener-Smidt P *et al.*, 1991).

3.1.2.2 Identificación Genotípica

La caracterización genotípica muestra mayor especificidad para la identificación de las distintas especies de *Acinetobacter*, además los métodos de identificación a nivel genético permiten conocer la relevancia clínica de la especie. Aunque estas técnicas muestran mayor sensibilidad y especificidad en la detección del patógeno, suelen ser caras y laboriosas por lo que no suelen ser empleadas como diagnóstico

rutinario microbiológico, su uso se limita a laboratorios de referencia (Gener-Smidt *et al.*, 1991).

Para la identificación a nivel especie, los métodos de referencian, incluyen el análisis de los patrones de restricción de los amplificadores de genes ribosomales (ARDRA) y el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Janssen *et al.*, 1997). Actualmente otros métodos desarrollados incluyen la detección del gen intrínseco de la carbapenemasa *bla_{oxa51}*, de *A. baumannii* (Turton *et al.*, 2006), el análisis de gen *gyrB* (Higgins *et al.*, 2007), PCR-ESI-MS y MALDI- TOF (Cheng *et al.*, 2016).

La identificación de especies por métodos genotípicos suele ser complicada y cara, por lo que los programas clínicos y de control nosocomial no la consideran relevante en la práctica diaria, solo requieren distinguir entre la especie de mayor gravedad clínica, es decir *A. baumannii* y las otras especies. Sin embargo, estos métodos son empleados comúnmente en la investigación clínica, ya que permite el conocimiento sobre la patogenia y los mecanismos moleculares de infección y resistencia.

3.2 Epidemiología.

Los miembros de género *Acinetobacter* eran considerados como microorganismos sin relevancia clínica, ubicuos en la naturaleza. Su hábitat natural es el suelo y el agua, aunque ha sido aislado de alimentos, artrópodos y es encontrado comúnmente en el ambiente.

Debido a la facilidad de crecimiento y la alta capacidad para usar diversas fuentes de carbono a través de diferentes vías metabólicas, *A. baumannii* ha sido encontrado en organismos vivos y compuestos inertes, aislado de material hospitalario incluyendo: catéteres, líquido de diálisis peritoneal, aparatos de ventilación mecánica, humidificadores y otros instrumentos usado en el área clínica. La gran capacidad de adherirse junto con su alta resistencia a la desecación y a las cambiantes condiciones del medio, le confieren facilidad para sobrevivir en

diferentes medios por largos periodos de tiempo y bajo diversas condiciones de sequedad y humedad. Adicionalmente, *A. baumannii* muestra bajo requerimiento de recursos para poder sobrevivir (Gayoso CM. *et al.*, 2013) y es capaz de soportar diferentes temperaturas y cambios de pH, se ha reportado una capacidad de tolerancia media de 27 días (Wong D *et al.*, 2017).

Además, *A. baumannii* puede sobrevivir en la piel y formar colonias (Scott N. *et al.*, 2014). Esta característica la convierten en una de las bacterias Gram-negativas más frecuentemente aislados del personal y equipo médico ([Rocha I. et al.](#), 2018). La colonización es poco común en la población general, se estima que hasta un 25% de la población normal presenta colonización cutánea, aunque también puede formar colonias en el tracto digestivo y respiratorio. Todos estos factores son determinantes en su fácil diseminación intrahospitalaria (Landaman D. *et al.*, 2002). A partir de estos reservorios de colonización se genera un aumento en la infección constituyendo un problema grave de salud en los últimos años. Se han reportado pequeños casos de infecciones causadas por *A. lwoffii*, sin embargo, *A. baumannii* es más frecuente y muestra menor sensibilidad a agentes antimicrobianos, por su resistencia a múltiples fármacos (Gales AC. *et al.*, 2001).

Actualmente las infecciones causadas por *A. baumannii* han incrementados en los últimos años, convirtiéndola en una de las BGN de mayor relevancia clínica. Estas infecciones pueden presentarse en forma de brotes epidémicos, circunscritos a una sola UCI y asociados a los diversos equipos clínicos que funcionan como reservorio biológico.

Las infecciones nosocomiales causadas por *A. baumannii*, han alcanzado altos niveles de incidencia colocando a este patógeno en uno de los microorganismos resistentes a múltiples fármacos (MDR) más importantes, identificados en los hospitales de todo el mundo (Nowak P *et al.*, 2016). Los pacientes UCI representaron hasta el 20% de las neumonías asociadas a ventilación mecánica e infecciones del torrente sanguíneo con *A. baumannii* (Tajeddin E *et al.*, 2016),

además, se estima que las tasas de mortalidad podrían alcanzar hasta 60% en pacientes inmunodeprimidos (Darvishi *et al.*, 2016).

La prevalencia de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) está aumentando en todo el mundo, en la actualidad no existe un programa de vigilancia nacional en México, pero estudios recientes informan brotes en hospitales particulares de todo el país (Djordjevic Z. *et al.*, 2016), en México se informó por primera vez la presencia de cepas resistentes a carbapenémicos en el periodo de vigilancia del año 2004 al 2016, reportando la presencia de Oxa 23, Oxa 58 y Oxa 72 (Figura 2) (Rodríguez CH, *et al.* 2018). El estudio realizado por Bocanegra en el 2015 demostró una frecuencia alta de genes *blaOXA-58* y *blaOXA-72* responsables de la resistencia a fármacos (Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015).

Figura 2: Distribución de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos.

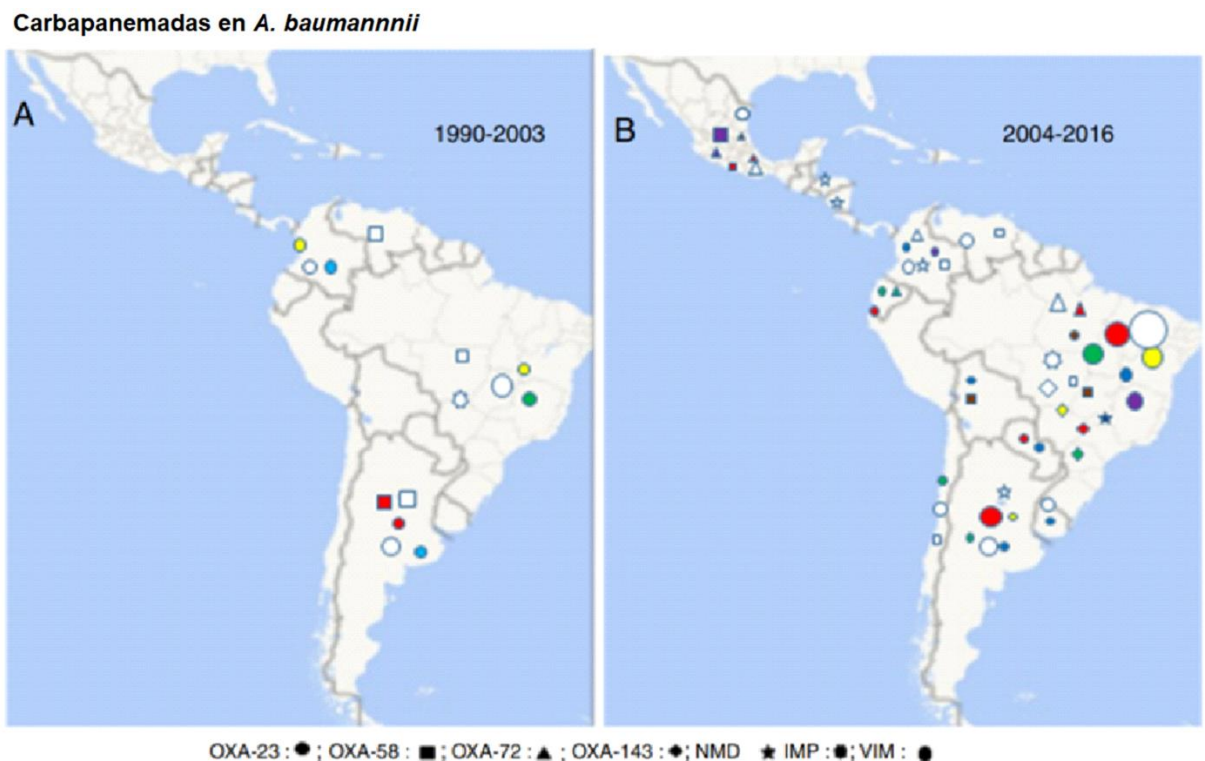


Figura 2: Distribución de cepas de *A. baumannii* con resistencia a carbapenémicos en América Latina (períodos de vigilancia 1990-2003 y 2004-2016). Se señala el parentesco clonal incluidas; OXA-23, OXA-57, OXA-72, OXA-143, NDM, IMP, VIM. (Rodríguez CH, *et al.* 2018)

3.2.1 Reservorios hospitalarios

Las infecciones por *Acinetobacter* han aumentado de forma significativa en pacientes hospitalizados, sobretodo paciente de la UCI. El incremento en su prevalencia, genera un problema grave de salud a nivel mundial gracias a su alta capacidad de adquirir resistencia a agentes antimicrobianos (Antunes L *et al.*, 2014).

Adicionalmente, de encontrar aislados en objetos inanimados, *A. baumannii* y otras especies como *A. calcoaceticus* y *A. Iwoffii* pueden encontrarse en piel humana, incluso algunas especies han mostrado tolerancia al jabón de uso hospitalario, por lo que puede ser aislado de las manos del personal médico (Quinn JP. *et al.*, 1998).

Las infecciones por *A. baumannii* ocurren normalmente en pacientes críticos por lo que la tasa de mortalidad cruda asociada es alta, aunque es importante señalar que es difícil determinar con certeza el impacto clínico ya que depende de la gravedad del paciente (Maragakis *et al.*, 2008), se señala que este aumento se relaciona con la capacidad de desarrollar resistencia a múltiples fármacos y al retraso de la detección de la infección temprana. Además, se asocia las infecciones por *A. baumannii* a un incremento de la estancia hospitalaria que depende del tipo de infección y resistencia asociada y un incremento del coste asistencial (aunque el impacto económico depende de la situación sanitaria) (Torres HA *et al.*, 2010).

3.3 Resistencia a múltiples fármacos.

A. baumannii se ha convertido en uno de los patógenos nosocomiales más importantes de los últimos años, este hecho se debe a su gran capacidad para adquirir resistencia a múltiples fármacos (Lin *et al.*, 2014). Posiblemente la alta prevalencia de aislados de *Acinetobacter* multirresistente a fármacos se debe a que este patógeno presenta diferentes mecanismos para adquirir resistencia, que incluyen β -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de eflujo, defectos de permeabilidad y modificaciones de los sitios objetivo. Además, *A. baumannii* muestra gran facilidad para el intercambio de material genético como plásmidos, transposones, integrones (Karah N *et al.*, 2016) y secuencias de inserción que facilitan la trasmisión de genes de resistencia entre bacterias presentes en el medio (Traglia *et al.*, 2014), por otra parte, otros factores que facilitan la generación de bacterias multirresistentes, es el consumo descontrolado de antimicrobianos por parte de los pacientes.

La alta capacidad de resistencia dificulta el tratamiento contra *A. baumannii*, disminuyendo la disposición actual de antibióticos para tratar las infecciones y controlar la dispersión de la enfermedad.

3.3.1 β Lactamasas

Unos de los mecanismos de resistencia más relevantes de *A. baumannii* es por medio de la inactivación de antibióticos β lactámicos por la presencia de β lactamasas. Los antibióticos β lactámicos son una amplia clase de antibióticos de uso disponible derivados de la penicilina, cefalosporinas, carbacefem y carbapenémicos que tienen un efecto bacteriolítico. Las β lactamasas se agrupan en distintas clases moleculares que incluyen A, B, C, y D (Jeon *et al.*, 2015), todos estos grupos de β lactamasas han sido identificadas en *A. baumannii*. en la tabla 1 se muestran las proteínas identificadas en este patógeno.

Tabla 1: β -Lactamases reportadas en *A. baumannii* (Lee et al., 2017)

Resistencia	Clase/subgrupo	Proteínas
β -Lactamases	Class A	TEM-1, GES-1, GES-5, GES-12, GES-11, GES-14, PER-1, PER-2, PER-7, TX-M-2, TX-M-15, OCS-1, VEB-1.
β -Lactamases	Class B	KPC-2, KPC-10, CARB-10, CARB-4, IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-8, IMP-11, IMP-19, IMP-24, VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-11, NDM-1.
β -Lactamases	Class C	NDM-2, NDM-3, SIM-1, AmpC.
β -Lactamases	Class D ; OXA-2 subgroup	OXA-21
β -Lactamases	OXA-10 subgroup	OXA-128
β -Lactamases	OXA-20 subgroup	OXA-137
β -Lactamases	OXA-123 subgroup	OXA-23, OXA-13, OXA-239
β -Lactamases	OXA-24 subgroup	OXA-133, OXA-239, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-143, OXA-182.
β -Lactamases	OXA-51 subgroup	OXA-51, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-678, OXA-68, OXA-70, OXA-71, OXA-69, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-79, OXA-80, OXA-104, OXA-106, OXA-112, OXA-113, OXA-96, OXA-92, v113,

		OXA-82, v83, OXA-84, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-91, OXA-93, OXA-95.
β -Lactamases	OXA-143 subgroup	OXA-253
β -Lactamases	OXA-235 subgroup	OXA-235

3.3.2 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo, son un mecanismo de resistencia que permite la expulsión de diferentes tipos de antibióticos. Estos transportadores pueden ser regulados por ADN cromosómico o plasmídico, los 3 tipos de sistemas de bombas más comunes son MFS (Mayor Facilitator Superfamily), RND (Resistance Nodulation-cell Division) y ABC (ATP Binding Cassette). En *A. baumannii* estas bombas están asociadas a la resistencia a imipenem y tigeciclina (Hu et al., 2007). De la familia de bombas RND, el transportador AdeABC es uno de los más estudiados, está asociado con la resistencia a aminoglucósidos, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclinas, fluoroquinolonas, trimetoprima, bromuro de etidio, antibióticos no fluoroquinolónicos y algunos β -lactámicos incluyendo carbapenémicos, este transportador cuenta con una estructura formada por tres proteínas transmembranales, AdeB es el componente transmembrana, AdeA es la proteína de fusión de membrana interna y AdeC es una proteína de membrana externa, esta bomba es codificada cromosómicamente por el operón AdeABC que es regulado por un sistema compuesto por dos proteínas, AdeS una proteína quinasas y su regulador de respuesta asociado AdeR, la sobreexpresión de estas bombas puede activarse por la presencia de antibióticos en el espacio (Marchand et al., 2004).

Las bombas CmlA y CraA se asocia con la resistencia al cloranfenicol (Roca et al., 2009) y TetA con la tetraciclina (Ribera et al., 2003), AmvA media la resistencia a diferentes clases de desinfectantes, detergentes incluso colorantes, como

eritromicina, acriflavina, cloruro de benzalconio y metil viológeno (Rajamohan *et al.*, 2010).

Tabla 2: Bombas de eflujo reportadas en *A. baumannii* (Lee *et al.*, 2017).

Resistencia	Clase/ subgrupo	Proteínas
bombas de eflujo	Resistance-nodulation-division superfamily	AdeABC
bombas de eflujo	Major facilitator superfamily	AdeFGH, AdeIJK, TetA
bombas de eflujo	Familia de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos	TetB, CmlA, CraA, AmuA, AbaF, AbeM.
bombas de eflujo	Pequeña familia de multirresistencia	AbeS
bombas de eflujo	Otros	EmiAB_Tolc, A1S_1535, A1S_2795, ABAYE_0913

3.3.2 Cambios en la permeabilidad

Los cambios en la permeabilidad producida por modificaciones de las proteínas de la membrana externa (OMP) de *A. baumannii* pueden inducir resistencia. Las porinas son proteínas que forman canales que permiten el transporte de moléculas a través de la membrana, la reducción de la expresión de algunas porinas como CarO, Omp37, Omp22-33, Omp33-36, Omp43, Omp44 y Omp47 están relacionadas con la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* (Catel-Ferreira *et al.*, 2011;). La reducción de la expresión de Omp29 se asocia a la producción de Oxa-51 y Oxa-23, carbapenemasas (Fonseca *et al.*, 2013). Las porinas OmpA y CarO son capaces de interactuar con OXA-23 confiriendo resistencia los antibióticos (Wu *et al.*, 2016).

Algunos de los componentes de la envoltura externa como la pérdida o modificación de los lipopolisacáridos (LPS), uno de los componentes de la membrana externa de BGN, pueden disminuir la integridad de la membrana y generar un aumento de resistencia a la colistina en *A baumannii* (Moffatt *et al.*, 2010).

3.4 Factores de virulencia

En *A. baumannii* se han identificado relativamente pocos factores de virulencias en comparación con otros patógenos Gram-negativos, diversos estudios a nivel genético y fenotípico han permitido identificar algunos factores presentes en *A. baumannii* como porinas, LPS, fosfolipasas (PLC), vesículas de membrana externa (OMV), sistemas de adquisición de hierro, zinc y manganeso, sistemas de secreción de proteínas tipo II, IV y V, proteínas de unión a la penicilina (PBP) y β -lactamasa entre otros (Harding *et al.*, 2018). En la tabla 3 se muestran los factores de virulencia reportados en *A. baumannii*.

Tabla 3: Factores de virulencia reportados en *A. baumannii*.

Factor de virulencia	Moléculas	Respuesta
Porinas	OmpA, Omp33-36, Omp22, CarO, OprD	Adherencia e invasión, inducción de apoptosis, resistencia sérica, formación de biopelículas, persistencia
Polisacárido capsular		Crecimiento en suero, supervivencia en infección tisular, formación de biopelículas
Lipopolisacáridos		Resistencia al suero, supervivencia en infecciones tisulares, evasión de la respuesta inmune del huésped
Fosfolipasas	PLC y PLD	Resistencia sérica, invasión, supervivencia in vivo
Vesícula de la membrana externa		Entrega de factores de virulencia, transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos
Sistema de adquisición de hierro	(acinetobactina y NfuA)	Supervivencia <i>in vivo</i> , persistencia, destrucción de las células huésped
Sistema de adquisición de zinc	(ZnuABC y ZigA)	Supervivencia <i>in vivo</i>
Sistema de adquisición de manganeso	(MumC y MumT)	Supervivencia <i>in vivo</i>

Sistema de secreción de proteínas	T2SS, T5SS, T6SS	Supervivencia <i>in vivo</i> , matanza de bacterias competidoras, colonización del huésped, formación de biopelículas, adherencia.
Proteína de unión a penicilina	PBP7 / 8 Pb	Resistencia sérica, supervivencia <i>in vivo</i> , adherencia
Otros	CipA, TuF, RecA, SurA1, Pili, UspA, GigABCD	Resistencia sérica, invasión, Resistencia al suero, Supervivencia <i>in vivo</i> , Resistencia al suero, Entrada de neutrófilos, Adherencia, formación de biopelículas.

(Lee *et al.*, 2017)

3.4.1 Porinas

Las porinas son proteínas de membrana externas (OMP) encargadas de modular la permeabilidad celular por la formación de poros, una de las principales porinas de *A. baumannii* es OmpA, reconocido como un factor de virulencia altamente caracterizado, se le asocia a la inducción de apoptosis en células epiteliales, mediante la liberación de moléculas proapoptóticas, como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (Wang *et al.*, 2014). Además, un estudio reveló que OmpA está implicada en la adherencia e invasión celular por la interacción con la fibronectina (Smani *et al.*, 2012) y promueve la formación de biopelículas y la motilidad superficial asegurando la supervivencia y persistencia del patógeno. Adicionalmente, OmpA permite la evasión del mecanismo de defensa por el sistema de complemento, al interactuar con el factor H del suero humano que permiten que *A. baumannii* no sea eliminado de la circulación (Kim *et al.*, 2009).

OmpA es capaz de producir resistencia a fármacos por la expulsión de estos desde el espacio periplasmático a través de la membrana externa asociado a bombas de

eflujo (Smani *et al.*, 2014). OmpA se ha convertido en un objetivo para el desarrollo de nuevos antibióticos y estrategias de prevención. Estudios de vacunación inversa proponen a OmpA como proteína inmunogénica o candidato vacunal contra *A. baumannii* (Hassan *et al.*, 2016)

Omp33-36 (33 a 36kDa) es una porina de OMP asociada con la citotoxicidad de *A. baumannii*, un estudio mostró que induce apoptosis por la activación de caspasas y la modulación de autofagia en diferentes tipos de células incluidas células inmunes del tejido conectivo (Rumbo *et al.*, 2014). Un estudio reveló que en la cepa JC10/01 de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos mostró pérdida de Omp33-36 que provocó la reducción de sensibilidad a estos antibióticos (Rumbo *et al.*, 2014).

Otra porina asociada al desarrollo de vacunas eficaces para el control de las infecciones por *A. baumannii* es Omp22, se ha encontrado que la inmunización con Omp22 reduce la carga bacteriana en órganos y sangre, así como los niveles séricos de citosinas y quimiocinas inflamatorias (Huang *et al.*, 2016). CarO también ha mostrado reducción de la virulencia (Lee *et al.*, 2017).

3.4.2 Lipopolisacáridos (LPS)

A. baumannii cuenta con factores patogénicos en su envoltura celular como LPS y polisacáridos capsulares importantes en su virulencia y supervivencia, diversos aislados de *A. baumannii* mostraron expresión de polisacáridos capsulares de superficie que contienen genes conservados conocido como locus K, los genes *ptk* y *epsA* son requeridos para la formación de la cápsula, necesarios para que *A. baumannii* sobreviva en los sitios de infección de tejido blando. Los polisacáridos capsulares se han propuesto como moléculas para la inmunización (Russo *et al.*, 2016). Se demostró que la presencia de antibióticos es capaz de inducir una hiperproducción de polisacáridos capsulares que aumentan la resistencia por el sistema de complemento y elevan la virulencia de *A. baumannii* (Geisinger e Isberg, 2015). Las modificaciones de los LPS disminuyen la susceptibilidad de *A. baumannii*

a la resistencia antimicrobiana, la glucotransferasa LpsB y la enzima LpxC están involucradas en la reducción de la virulencia y disminución de supervivencia en modelos de ratas (Chin *et al.*, 2015).

Los LPS son el componente principal de la membrana externa de *A. baumannii*, están compuestos por un lípido A endotóxico, un núcleo de oligosacárido y un antígeno O repetitivo (Lee *et al.*, [2013](#)). Los LPS inducen la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-8 de los macrófagos de forma dependiente del factor toll-like 4 (TLR4) (Geisinger *et al.*, 2015).

Figura 3: Producción de toxinas

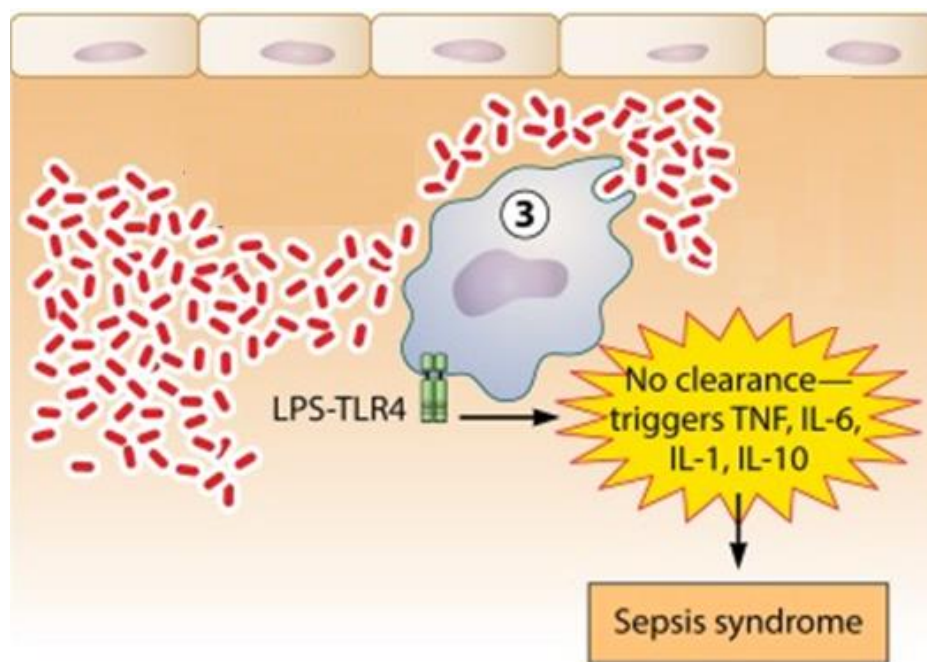


Figura 3: Los LPS interactúan y activan los receptores TLR4 de la célula dendrítica, esta interacción conduce a la activación de cascadas de señalización río abajo que

culminan con la liberación de interleucinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-10 y el factor de necrosis tumoral alfa, esta respuesta induce el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de infección, pero al mismo tiempo activa procesos infecciosos que conducen a la sepsis bacteriana.

(Wong *et al.*, 2017)

3.4.3 Vesículas de la membrana externa

Las vesículas de la membrana externa (OMV) están compuestas por LPS, fosfolípidos, proteínas periplasmáticas, lípidos de la membrana externa y ADN. Estas permiten la interacción de los patógenos con las células huésped a través de la internalización de factores de virulencia a las células. *A. baumannii* es capaz de secretar OMV que contienen OmpA, proteasas y fosfolipasas, Estas OMV pueden interactuar con la superficie de células huésped por la presencia de balsas lipídicas, produciendo expresión de genes citotóxicos como citosinas proinflamatorias, por lo que inducen una respuesta inmune innata mayor (Li ZT *et al.*, 2015). Gracias al papel de las OMV en la virulencia de *A. baumannii* se han propuesto como agentes vacúnales acelulares para aumentar la inmunidad protectora (Huang *et al.*, 2014)

3.4.4 Sistema de adquisición a metales

Las bacterias aeróbicas producen quelantes de hierro de alta afinidad conocidos como sideróforos, para superar su limitación a la disposición de hierro férrico. *A. baumannii* cuenta con un sideróforo de tipo mixto compuesto por un anillo de oxazolina derivado de treonina conocido como acinetobactina, este es considerado un factor de virulencia importante implicado en el mantenimiento del patógeno dentro de células epiteliales y asociado al daño celular y la muerte del animal. Un estudio determinó que la producción de acinetobactina ocurre con alta frecuencia en aislados de *A. baumannii* MDR (Megeed *et al.*, 2016).

La producción de calprotectina es un mecanismo de acción empleado por *A. baumannii* en respuesta a la limitación de manganeso (Mn), la calprotectina induce un aumento de la transcripción del transportador de Mn NRAMP (proteínas de macrófagos asociados a la resistencia natural) y la transcripción de urea carboxilasa MumC que reduce la actividad antimicrobiana de la calprotectina, además estos resultados sugieren que ambas proteínas permiten que *A. baumannii* pueda utilizar urea como única fuente de nitrógeno (Juttukonda *et al.*, 2016).

3.4.5 Sistema de secreción de proteínas

A. baumannii cuenta con diferentes sistemas de secreción, como el sistema de secreción tipo II (T2SS) compuesto por una ATPasa de secreción citoplasmática, este sistema funciona a partir del transporte de las proteínas dianas por el sistema secretor general (Sec) al periplasma donde serán expulsadas por T2SS. Algunos sustratos de T2SS identificados en *A. baumannii* son las lipasas: LipA, LipH y LipAN y la metalopeptidasa CpaA (Harding *et al.*, 2016).

El sistema de secreción tipo VI (T6SS) en *A. baumannii* está compuesto por un clúster de 18 genes conservados denominados genes tss (type six secretion) y genes asociados al T6SS denominado tag, que son genes que atribuyen a la regulación estructural. La principal función del T6SS es la secreción de toxinas antibacterianas como: muramidasa o glucósidos hidrolasas, nucleasas y lipasas, que promueven la competencia bacteriana. Gracias a este mecanismo *A. baumannii* es capaz de competir contra una amplia variedad de bacterias nosocomiales o incluso contra cepas del mismo género (Repizo *et al.*, [2015](#)).

El sistema de secreción V, fue el primer sistema de secreción identificado en *A. baumannii*, conocido como auto-transportador trimétrico (Ata), este sistema media la formación de biopelículas y la adherencia a componentes de la matriz extracelular. Ata, se une a varias proteínas de la matriz extracelular y es necesario

para la virulencia completa, la formación de biopelículas y la adhesión por lo que se propuso como un agente vacunal contra este patógeno (Bentancor *et al.*, 2012).

3.4.6 Proteínas de unión a la penicilina y β lactamasas PER1

La PBP7/8 es un factor de virulencia determinante en *A. baumannii*, las cepas mutantes muestran reducción en la tasa de crecimiento en suero humano y disminuyen la supervivencia en modelos de infección de tejido blando, un estudio determinó que PBP7/8 tiene un efecto en la estructura de peptidoglicano, se demostró que la pérdida de este PBP afectaba la susceptibilidad del huésped a los factores de virulencia (Lee *et al.*, 2017). La β -lactamasa PER1 BLEE es un factor de virulencia en *A. baumannii* ya que se asocia a la producción de adherencia celular (Lee *et al.*, 2017).

3.4.7 Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas lipolíticas requeridas en el metabolismo de fosfolípidos, la degradación de los fosfolípidos desestabiliza las membranas celulares produciendo interferencia en los procesos de señalización involucrados en la respuesta inmune. Existen 3 clases descritas, la fosfolipasa A (PLA), que hidroliza ácidos grasos del esqueleto de glicerol, la fosfolipasa C (PLC), que separa el grupo principal fosforilado del fosfolípido, y la fosfolipasa D (PLD) que se separa del grupo principal. En *A. baumannii* se han identificado PLC y PLD como importantes factores de virulencia, la inactivación de estas conducen a la reducción del efecto citotóxico en células epiteliales y a la disminución de la resistencia en suero (Fiestar *et al.*, 2016).

3.4.8 Biopelículas

Las biopelículas son comunidades microbianas encerradas en una matriz extracelular, estas juegan un papel importante en el proceso de infección,

específicamente en la interacción de *A. baumannii* con su huésped, además la formación de biopelículas está implicada en la infección asociada a dispositivos médicos (Harding *et al.*, 2018). La formación de biopelículas se produce dentro de las infecciones de la piel y tejidos blandos (Thompson MG. *et al* 2014). En los equipos de uso médico también se produce una robusta formación de biopelículas como en tubos endotraqueales, material médico de policarbonato y acero inoxidable (Greene C. *et al.*, 2016). Además, esta capacidad de producir biopelículas genera una mayor tolerancia al estrés extracelular, las adhesinas, los polisacáridos capsulares y los apéndices capsulares contribuyen a la formación y mantenimiento de estas estructuras (Greene C. *et al.*, 2016).

3.4.9 Adhesinas

La adhesión celular es el paso inicial en la patogénesis de *Acinetobacter baumannii*. Sin embargo, hay relativamente poca información sobre los mecanismos por los cuales *A. baumannii* se une e interactúa con las células huésped. *A. baumannii* se adhiere con más avidez a la fibronectina gracias a la presencia de proteínas de unión a la fibronectina (FBP). Estas proteínas se unen a receptores de la célula hospedera con las proteínas de la matriz extracelular (ECM) como integrinas y fibronectina. Se han identificado al menos tres FBP en *A. baumannii* como; OmpA, tonB y Omp34kDa (Smani *et al.*, 2012).

Además de estas proteínas, *A. baumannii* cuenta con adhesinas responsables de la interacción con las células epiteliales, una de las principales adhesinas descritas es el auto transportador trimérico de *Acinetobacter* conocido como Ata, este transportador facilita la unión de la bacteria a los tejidos del huésped a través de la interacción con el colágeno de tipo IV. Esta proteína se encuentra en la membrana externa y está constituida por una péptida señal, un dominio pasajero expuesto a la superficie n- terminal y un dominio c- terminal (Smani *et al.*, 2012).

La proteína asociada a la formación de biopelículas BAPs, también es considerada una de las adhesinas importantes en *A. baumannii* ya que participa en los procesos de adhesión a células epiteliales.

A. baumannii no era considerada como una bacteria intracelular, sin embargo, estudios recientes conformaron que es capaz de invadir las células epiteliales mediante un mecanismo similar a una cremallera, que se asocia con mecanismos de captación dependientes de microfilamentos y micro túbulos (figura 4) (Choi *et al.*, 2008).

Figura 4: Internalización de *A. baumannii* en células epiteliales

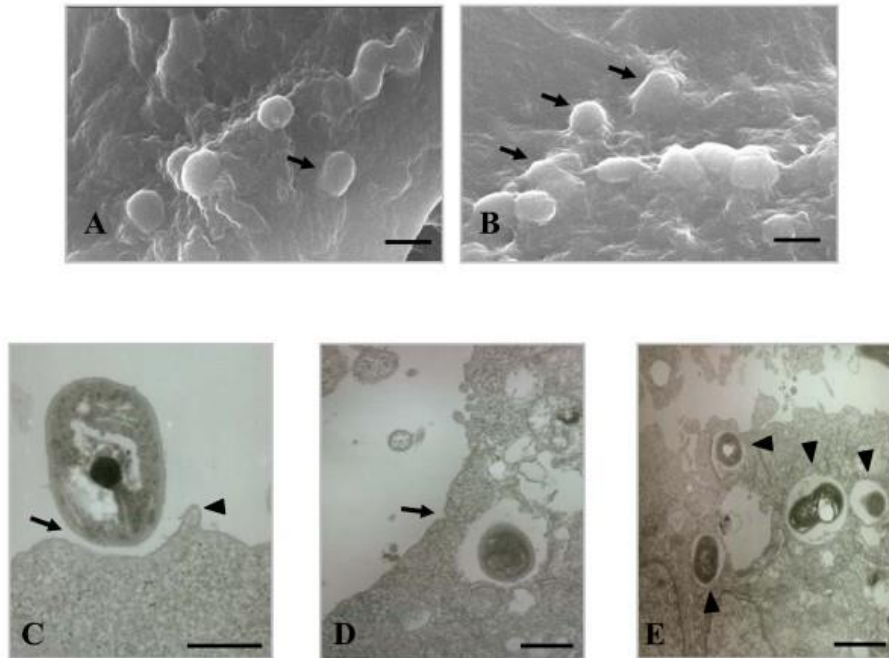


Figura 4: Una vez que se establece la interacción de la bacteria a través de la fibronectina (A y B) se produce un alargamiento de la membrana (C) que conduce a la internalización del patógeno (D), las bacterias internalizadas se localizan en las vacuolas unidas a la membrana (E).

(Choi *et al.*, 2008).

3.5 Respuesta inmune innata a la infección

A. baumannii es capaz de interactuar con células epiteliales de la mucosa, así como con células endoteliales, cuando la infección ocurre en el torrente sanguíneo (Weidensdorfer M *et al.*, 2015). La capacidad de interactuar con estas células depende de la presencia de adhesinas como Ata, Pili y Bap (Piepenbrink KH. *et al.*, 2016).

Los componentes del sistema inmune innato como los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos específicos (PAMP) de *A. baumannii*. El receptor extracelular PRR Toll like 4 (TLR4), que reconoce el lípido A de lipooligosacárido (LOS), permite limitar la carga de *A. baumannii* en los modelos de infección neumónica y sistémica.

Si bien *A. baumannii* es un patógeno que invade de forma extracelular, se ha reportado que es capaz de establecerse en células epiteliales por un mecanismo de absorción similar al mecanismo de cremallera (Choi CH *et al.*, 2008). Los PRR intracelulares participan en la detección de *A. baumannii* cuando persiste dentro de las vacuolas unidas a la membrana dentro del citoplasma celular, la señalización del PRR endolisosómico TLR9, detecta ADN de origen bacteriano limitando la infección y la diseminación de *A. baumannii* asociadas a la neumonía (Noto MJ *et al.*, 2015). Los PRR citosólicos como NOD1, NOD2 y RIP2 de igual forma limitan la proliferación intracelular de *A. baumannii* en células epiteliales (Noto MJ *et al.*, 2015), y desencadenan cascadas de señalización río abajo activadas por NF- κ B, la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno y la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-8 (March C *et al.*, 2010).

Como primera línea de defensa por parte de las células epiteliales tras la detección de *A. baumannii*, se secretan péptidos antimicrobianos como β -defensina 2 humana y β -defensina 3 humana que inhiben el crecimiento del patógeno (Feng Z *et al.*, 2014). Al mismo tiempo la señalización de citocinas y quimiocinas, permite el

reclutamiento de células fagocíticas, como neutrófilos, al sitio de infección, por ello se produce un agotamiento de neutrófilos mediado por anticuerpos que genera un aumento de patogénesis y provoca mortalidad severa (Breslow JM *et al.*, 2011), esto es mediado por la actividad del sistema NADPH oxidasa, que genera especies reactivas de oxígeno para la eliminación de bacterias fagocitadas. Los neutrófilos son las células fagocíticas más importantes en la respuesta contra *A. baumannii* sin embargo los macrófagos y las células dendríticas participan en la detección y señalización del patógeno, aunque también son capaces de inducir la eliminación de *A. baumannii* (Breslow JM *et al.*, 2011).

Figura 5. Respuesta inmune innata a la infección por *A. baumannii*.

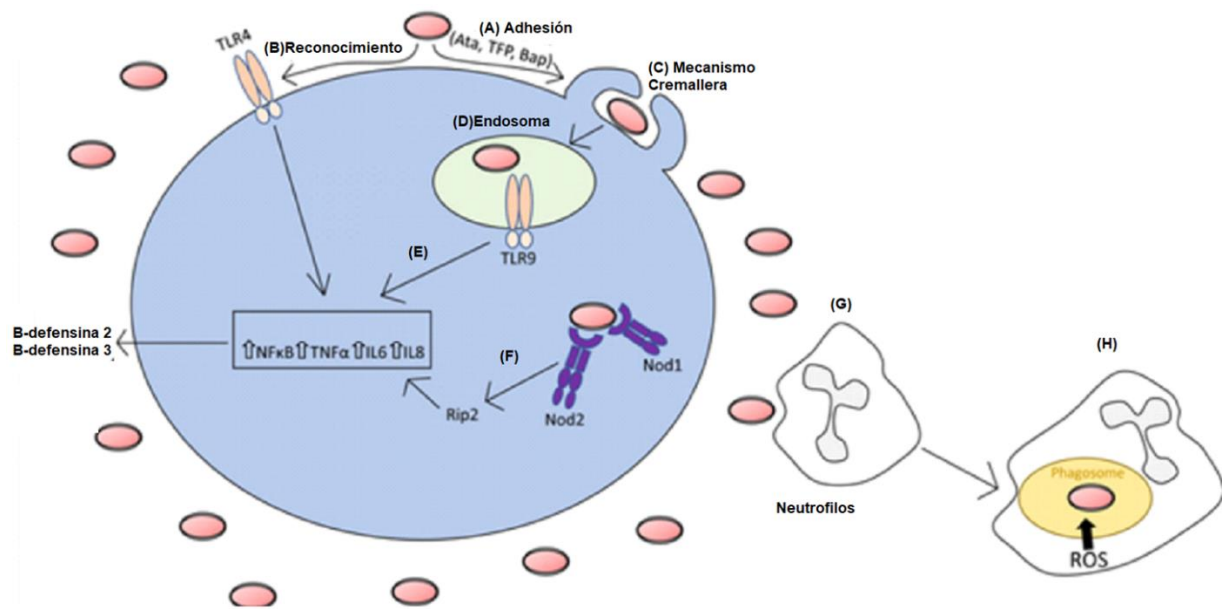


Figura 5. Respuesta inmune innata a la infección por *A. baumannii*. (A) Adhesión a células epiteliales por Ata, Bap y TFP. (B) Reconocimiento de adhesinas por TLR4. (C) internalización de bacterias por el mecanismo Cremallera. (D) Reconocimiento intracelular por TLR9. (E) Señalización activada por NF-κB y liberación de IL6, IL8 y NFκB. (F) Reconocimiento intracelular por Nod1, Nod2 y Rip2 citosolicos. (G) Reclutamiento de Neutrófilos. (H) Liberación de ROS. (Harding *et al.*, 2018).

3.6 Evasión de la respuesta inmune

La evasión de la respuesta inmune, es considerada como un mecanismo necesario para que *A. baumannii* pueda establecerse en las células dianas y conducir a los procesos infecciosos. *A. baumannii* utiliza diferentes factores de virulencia para evadir la respuesta inmune. Las presencias de polisacáridos capsulares de la superficie bacteriana, juegan un papel clave para la evasión inmunitaria, sin embargo, se encontró que las proteínas secretadas y las vías metabólicas, también participan en la defensa contra el sistema inmunológico (Geisinger E. *et al.*, 2019).

Uno de los mecanismos más importantes es la heptaacilación del lípido A del lipooligosacárido (LOS) que fortalece la membrana externa protegiendo a *A. baumannii*, contra péptidos antimicrobianos catiónicos como la Colistina y la lisozima. Otra estrategia bacteriana que la protege contra el sistema inmunológico es la presencia de polisacáridos capsulares altamente hidrófilos cargados negativamente, este mecanismo es utilizado para repeler la interacción con superficies cargadas negativamente, de esta forma evita la interacción con neutrófilos y macrófagos. Además, esta capsula funciona como una barrera física que protege a la bacteria contra la muerte celular mediada por el sistema del complemento, la degradación de lisozimas y las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Además de los glicoconjugados de superficie, los factores de virulencia de *A. baumannii* como las proteínas de la membrana externa (Omp) participan en la evasión de la respuesta inmunológica. Estudios anteriores han descrito que la proteína OmpA inducen la producción de ROS, lo que lleva a una apoptosis de inicio temprano y necrosis de inicio tardío en células dendríticas (DC), además OmpA interactúa con el factor H (FH), inhibiendo así la destrucción mediada por el complemento (Lee *et al.*, 2010).

Otras proteínas que expresa *A. baumannii* que contribuyen a la resistencia al sistema inmune es la serin proteasa del factor de destrucción de proteínas (PKF) y CipA. Se reportó que CipA puede inhibir la vía alternativa del sistema del complemento, CipA es una proteína de unión al plasminógeno, recientemente descrita. El plasminógeno es escindido y convertido en una serin proteasa, que degrada el fibrinógeno y el componente del sistema del complemento C3b. La serin proteasa PKF está involucrada en la degradación de componentes del sistema del complemento. Tanto CipA como PKF son proteínas secretan a través de un sistema de secreción de tipo II (T2SS), este sistema permite la secreción de proteínas efectoras de *A. baumannii* (Morris F. *et al.*, 2019)

Otro de los mecanismos de evasión es la presencia de fosfolípidos expuestos a la superficie ya que funcionan como activadores potenciales de la vía alternativa del complemento. El sistema Mla evita la acumulación de fosfolípidos en la membrana externa.

La conversión en acetil-coenzima A (CoA) y succinil-CoA, actúan como un mecanismo de evasión al eliminar de la célula el fenilacetato, un atrayente de neutrófilos (Teufel *et al.*, 2010).

A. baumannii es capaz de adherirse a los neutrófilos y de esta forma diseminarse a otros órganos por la migración inversa de los neutrófilos. Además, es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos al inducir la activación de la catalasa por la producción de ROS que le permite resistir el estrés oxidativo (Sato Y *et al.*, 2019).

Figura 6: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *A. baumannii*

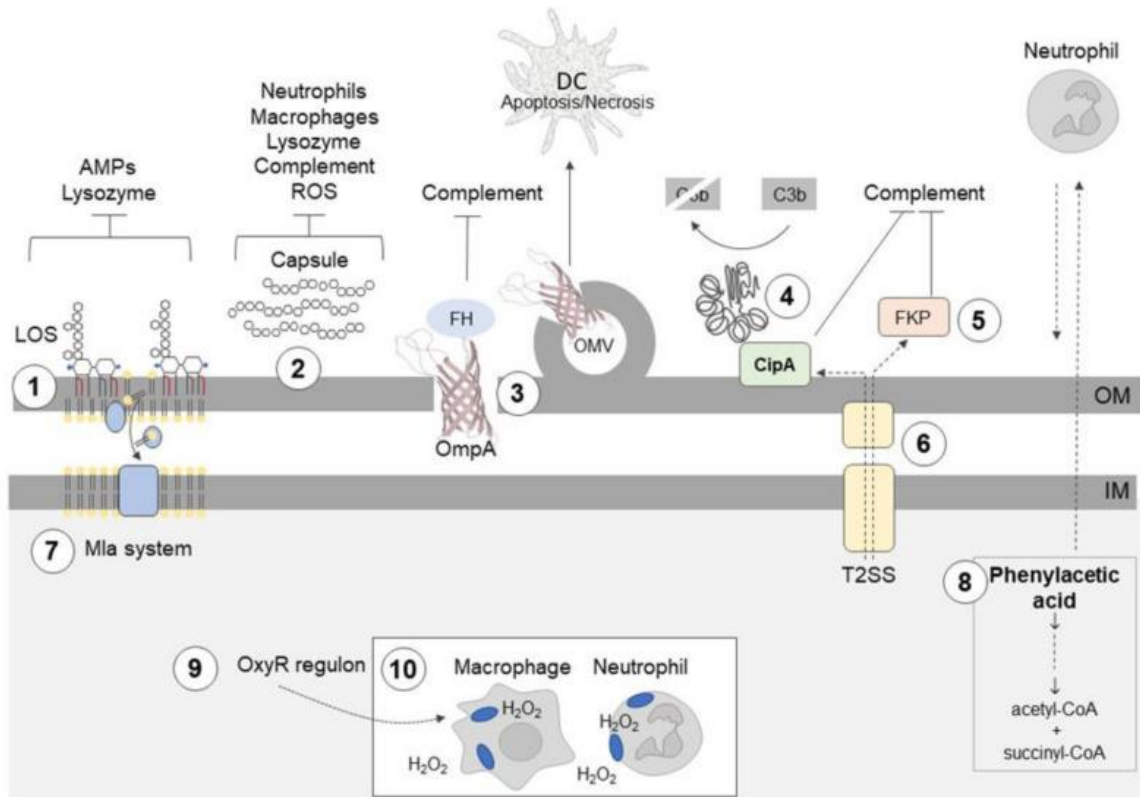


Figura 6: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *A. baumannii*. 1) Heptaacilación del lípido en LOS, protege contra Lisoenzimas y AMPs. 2) Los polisacáridos capsulares que interfieren con la interacción con neutrófilos, macrófagos, y protege contra lisoenzimas, especies ROS y muerte por el complemento. 3) OmpA interactúa con el factor H (FH) inhibiendo la destrucción mediada por el complemento. 4) CipA forma un complejo que degrada C3b; CIPA. 5) PKF inhibe la vía alternativa del complemento. 6) T2SS secreta proteínas como CipA y PKF. 7) El sistema Mia evita la acumulación de fosfolípidos. 8) El Fenilacetato se convierte en Acetil CoA y succinil-CoA. 9) El regulador positivo OxyR activa la transcripción de genes asociados a mejorar la actividad catalasa que protege contra ROS. 10) Internalización de *A. baumannii* a través de los macrófagos y neutrófilos.

3.7 Confección COVID-19 y *A. baumannii*

El problema actual causado por el virus SARS-CoV-2 (Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2) reportado por primera vez en diciembre del 2019, se ha extendido hasta convertirse en una pandemia que sigue afectando a millones de personas (Zu *et al.*, 2020). Las manifestaciones clínicas van desde una infección asintomática hasta el desarrollo de una neumonía agravada que requiere hospitalización en la unidad de cuidados intensivos (UCI) con equipo de respiración asistida (Mohlenkamp *et al.*, 2020).

El ingreso a los hospitales y el estado de inmunosupresión inducido por el virus y/o fármacos aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias (Mehta P *et al.*, 2020). Las coinfecciones bacterianas asociadas a infecciones virales respiratorias aumentan la gravedad y mortalidad de la enfermedad (Metzger DW *et al.*, 2013), sin embargo, es difícil confirmar si el aumento en la mortalidad podría deberse específicamente a las asociaciones bacterianas, se estima que más del 50% de las muertes por COVID -19 experimentan infecciones bacterianas secundarias (Lai *et al.*, 2020).

Las IAAS adquiridas en el hospital, se propagan dentro de las 48-72 horas posteriores al ingreso a través del contacto entre pacientes o por dispositivos e instrumentos médicos (Agaba P *et al.*, 2017). El equipo de respiración asistida que se requiere para tratar pacientes con Covid-19 representa una fuente de posible contaminación bacteriana que al entrar en contacto con los pacientes podría conducir a infecciones secundarias. Algunas especies bacterianas relacionadas incluyen: *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii* (Smith AM *et al.*, 2014). Este último representa uno de los patógenos más importantes de IAAS, agente causal de neumonía conocida como neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV).

En los últimos 2 años se ha prestado particular interés por *Acinetobacter baumannii* debido a la relación con infecciones secundarias asociadas a pacientes con COVID-19. La neumonía asociada a ventilación causada por infecciones secundarias bacterianas en pacientes con COVID-19 empeoran la condición clínica del paciente. Lescure y colaboradores identificaron *A. baumannii* como agente principal causante de NAV en un paciente infectados son SarCov2 (Shiralizadeh S *et al.*, 2018).

Los brotes causados por *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) en hospitales de UCI que atienden pacientes con COVID-19 representa una amenaza urgente. En la investigación llevada a cabo en el hospital de Nueva Jersey en la UCI dedicado a la atención de pacientes COVID-19, se identificaron coinfecciones por CRAB, este estudio observacional demostró que la incidencia de CRAB es mayor en pacientes con COVID-19 que pacientes negativos con un 62% (Lescure F.*et al.*, 2020).

En la investigación realizada por Sharifipour donde se evaluaron coinfecciones bacterianas del tracto respiratorio en pacientes ingresados a la UCI por COVID-19, los resultados arrojaron que el 90% de los pacientes mantenía una coinfección con *A. baumannii*, donde se reportaron 17 cepas multirresistentes, al final del estudio estos pacientes no sobrevivieron, este aumento en la mortalidad podría estar asociado con la infección de *A. baumannii*, sin embargo, aún faltan más estudios que lo confirmen (Perez S *et al.*, 2020).

3.8 Inmunoproteómica en la detección de candidatos vacúnales

La situación actual de las infecciones por *A. baumannii* hacen necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores que pueden funcionar como indicadores del estado patológico.

Diversas características como la regulación de la maquinaria biológica, las modificaciones postraduccionales o las interacciones proteicas, no se pueden deducir directamente a partir de estudios genómicos y transcriptómicos. El uso de

métodos proteómicos, como la inmunoproteómica supone una nueva estrategia para la detección de biomarcadores de tercera generación que aportan conocimiento sobre procesos evolutivos en la infección, así como la identificación de la expresión diferencial de proteínas específicas implicadas en los procesos de infección, resistencia antimicrobiana, factores de virulencia, y proteínas de interés clínico, como antígenos candidatos para el diseño de vacunas o inmunoterapias para infecciones oportunistas (Fajardo Bonin *et al.*, 2014).

El estudio realizado por Fajardo Bonin en 2014, se basó en un enfoque inmunoproteómico, permitiendo la detección de proteínas inmunogénicas utilizando suero de pacientes infectados por *A. baumannii*. Estas proteínas tienen uso potencial de candidatos vacúnales; se detectaron diferentes proteínas de la membrana externa como; OmpA, Omp34kDa, OprC, OprB-like, OXA-23 (Fajardo Bonin *et al.*, 2014).

3.8.1 Biomarcadores en *Acinetobacter baumannii*.

Los biomarcadores de primera generación son las sustancias detectadas en el torrente sanguíneo u otros fluidos de pacientes infectados, cuya detección se realiza a partir de métodos bioquímicos o inmunológicos como; ELISA, cromatografía, ensayos turbidimétricos, ensayos enzimáticos – colorimétricos y cromatografía gas – líquido (Bitrian *et al.*, 2012).

El estudio de biomarcadores de virulencia del género *Acinetobacter*, en el cual se analizaron nueve cepas de *Acinetobacter* de pacientes y entornos hospitalarios, mostraron propiedades en común como crecimiento en condiciones limitadas de hierro, formación de biopelículas, ausencia de secreción activa de proteasa, producción significativamente mayor de catecol en aislados de pacientes, aunque otros marcadores como la secreción de lipasa, la motilidad celular, la resistencia a los antibióticos y la producción de hemolisina, mostraron gran variabilidad (Bitrian *et al.*, 2012).

Debido a que estos marcadores de primera generación no muestran alta sensibilidad ni especificidad, se ha optado por el uso de otras estrategias metodológicas para la detección de nuevos biomarcadores.

La disposición de la secuencia genómica de *A. baumannii* ha impulsado el desarrollo de técnicas moleculares que permiten la detección de biomarcadores de segunda generación, el empleo de técnicas genómicas y transcriptómicas es una apuesta biómica para el descubrimiento de nuevos biomarcadores más específicos.

El trabajo publicado por Hassan en el 2016, basado en el enfoque combinado de pangenómica y ensayos *in silico*, permitió la detección de diferentes marcadores biológicos con uso potencial para tratamiento. Estos análisis determinaron diferentes proteínas de la membrana celular que al mismo tiempo son importantes factores de virulencia y que forman parte de las proteínas esenciales como; AdeK, PonA, OmpA, FhuE, T6SS, MotB, TonB (Hassan *et al.*, 2016).

3.9 Candidatos Vacúnales

La problemática actual de la resistencia a agentes antimicrobianos por parte de *A. baumannii*, ha generado la necesidad del desarrollo de candidatos a vacunas (VaC) como estrategia para la prevención de infecciones. Las células enteras inactivadas y las cepas atenuadas pueden generar la producción de anticuerpos contra múltiples proteínas de superficie, que pueden ser usados como VaC, capaces de combatir la amenaza creciente de resistencia ante agentes antimicrobianos.

Actualmente no existe una vacuna autorizada contra las infecciones por *A. baumannii*, algunas proteínas se han propuesto como VaC, como los complejos de membrana externa MAC, vesículas de membrana externa OMV, la porina OmpA, el autotransportador Ata, la proteína asociadas a biopelículas Bap, polisacáridos capsulares K1 y poli-NSe y -acetil- β - (1-6) -glucosamina PNAG. Estas proteínas son capaces de inducir la producción de anticuerpos y activar la respuesta inmune contra la infección (Chiang *et al.*, 2015).

Otro estudio de construcciones de redes de todo el interactoma de proteínas genómicas permitió la identificación teórica de VaC moleculares y objetos farmacológicos en *A. baumannii* MDR, en este estudio se identificó como VaC a BamA, Ndk nucleósido difosfato quinasa, Mdh malato deshidrogenasa y otras proteínas anteriormente descritas (Mujawar *et al.*, 2019).

Un análisis de vacunación inversa (RV) del genoma de *A. baumannii* permitió la identificación de nuevas proteínas no descritas anteriormente como posibles VaC, algunas de ellas mostraron alta respuesta inmunogénica como OmpK, FKBP-tipo 22KD peptidil-prolil cis-trans isomerasa (FKIB) y Ompp1. Posteriormente estas proteínas fueron probadas experimentalmente y demostraron ser altamente inmunogénicas y se observó que conferían protección parcial (60%) en un modelo animal de neumonía en ratones (Chiang *et al.*, 2015)

Un estudio de predicción *in silico* y de RV en *A. baumannii* permitió la identificación de posibles VaC. La proteína de ensamblaje del barril β de la membrana externa, BamA, se predijo como un posible VaC *in silico*. Aunque BamA no se caracteriza en *A. baumannii*, está altamente conservado entre las BGN debido a su papel crucial en el ensamblaje de proteínas de la membrana externa (Singh *et al.*, 2017).

Las aplicaciones clínicas de los diferentes VaC son limitadas debido a que estos antígenos no se dirigen específicamente a la resistencia a los antibióticos, la producción de enzimas β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más común en *A. baumannii*, un estudio en *Pseudomonas aeruginosa* resistente, informó que la inmunización con proteínas β -lactamasas podría inducir respuesta de antígenos neutralizantes y una reducción en la carga bacteriana y en los niveles de patogenicidad (Ciofu *et al.*, 2003) sin embargo, esta investigación aun es limitante, por lo que es preciso la identificación de más antígenos de vacunas que estimulen mejor la respuesta inmune contra las infecciones así como las resistencias a fármacos.

La emergencia de cepas extremadamente resistentes (XDR) de *A. baumannii* que pueden generarse a partir de la selección inmune, conduce a la variabilidad de la secuencia antigénica y por lo tanto a la reducción de la regulación de antígenos objetivos, produciendo una protección cruzada deficiente, por lo que la identificación de agentes vacúnales en cepas emergentes durante las infecciones sigue siendo un problema complejo.

Esta emergente aparición de cepas XDR enfatiza la urgencia de desarrollar nuevos enfoques de tratamiento. El desarrollo de vacunas supone una estrategia segura para la prevención y control de los brotes hospitalarios, el uso de proteínas inmunogénicas, representa un enfoque menos tóxico para la salud. La inmunoproteómica es una nueva estrategia para la detección de proteínas inmunogénicas que aportan resultados sobre los procesos evolutivos en la infección como; resistencia antimicrobiana y factores de virulencia, que suponen proteínas de interés clínico como candidatos vacúnales.

Tabla 4: Candidatos vacúnales contra *A. baumannii*

VaCs	Antígeno	Cepa	Adyuvante	Cepa de ratón	Vía	Dosis	Supervivencia %	Referencia
	rHis-Blp1 ₍₂₆₅₂₋₃₃₆₂₎	Ab1	Coadyuvante de Freund	BALB / c	IM	10 ⁸ UFC	60%	(Skerniškytė <i>et al.</i> , 2019)
	rHis-Bap	Aislado clínico	Coadyuvante de Freund	BALB / c	IM	10 ⁸ UFC	80%	(Fattahian <i>et al.</i> , 2014)
	OmpA	HUMC1	Alumbre	Retired breeder or juvenile BALB / c	SC	2 × 10 ⁷ CFU	Retired breeder—50% Juvenile—45%	(Luo <i>et al.</i> , 2012)
Subunidad purificada o recombinante	rHis-FilF	19606	Coadyuvante incompleto de Freund	BALB / c	SC	10 ⁸ UFC	50%	(Singh R <i>et al.</i> , 2016)
	BamA	19606	Alumbre	BALB / c	SC	10 ⁹ UFC	70%	(Singh R <i>et al.</i> , 2017)
	rHis-CsuA / B y rHis-FimA	19606	Coadyuvante completo de Freund	BALB / c	SC	2 × 10 ⁸ UFC	Csu-Fim: 60% Fim: 50% Csu: 33,3%	(Ramezanalizadeh F <i>et al.</i> , 2020)
	rHis-PKF con OmpA	19606	Alumbre	C57BL / 6	IP	10 ⁸ UFC	85,71%	(Bolourchi N <i>et al.</i> , 2019)
ADN	genes OmpA	LAC 4	CpG	C57BL / 6	IM	3 × 10 ⁷ UFC	50%	(Ansari <i>et al.</i> , 2019)
Bacterias enteras	(Ali190) BG		Adyuvante de Freund	Sprague-Dawley rats	Oral, SC, IM, IP, SCA, IMA	10 ⁸ CFU	Oral—67% SC, IM, IP, SCA, IMA—100%	(Sheweita S.A <i>et al.</i> , 2019)
	<i>A. baumannii</i> Δ <i>trxA</i>	Aislado clínico		C57BL / 6	IP, SC	10 ⁴ – 10 ⁷ UFC	IP: 100% SC: 90%	(Ainsworth <i>et al.</i> , 2017)

4. Hipótesis

Acinetobacter baumannii expresa proteínas inmunogénicas detectadas a partir de un enfoque inmunoproteómico con el uso de sueros de voluntarios expuestos al patógeno.

5. Objetivos

5.1 General

Detección de proteínas inmunogénicas expresadas en *Acinetobacter baumannii* a partir de sueros de voluntarios expuestos a la infección por *A. baumannii*.

5.2 Particulares

- Obtención del inmunoproteoma de *Acinetobacter baumannii*.
- Detección de proteínas inmunogénicas en *Acinetobacter baumannii*
- Caracterizar *in silico* proteínas inmunogénicas expresadas en *Acinetobacter baumannii*.

6 Metodología

6.1 Diseño experimental

Para la obtención del proteoma, trabajamos con cepas diferentes de *A. baumannii* multirresistentes, provenientes de diferentes aislados clínicos, las proteínas fueron separadas por electroforesis bidimensional (2-DE), posterior a la separación las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para la obtención del inmunoproteoma se usaron sueros de voluntarios expuestos a la infección. Las proteínas se detectaron por un análisis comparativo de acuerdo al punto isoeléctrico y talla molecular por un análisis comparativo bibliográfico.

6.1.2 Muestras

Suero

Las muestras utilizadas en este análisis fueron donadas por pacientes ingresados a la UCI del hospital Ramón de la Fuente Muñiz con síntomas agravados por Covid-19, los voluntarios seleccionados para este estudio cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Firma del consentimiento informado.
- Ingreso a la UCI.
- Presentan síndrome respiratorio agudo.
- Los voluntarios seleccionados para este estudio se mantuvieron en equipo de respiración asistida.

Debido a la elevada asociación de la bacteria por contaminación del equipo de respiración asistida descrito en el apartado 3.7 de los antecedentes, sospechamos la presencia de una coinfección por *A. baumannii*. Lo cual fue comprobado a partir de la detección de anticuerpos por análisis de western blot. Las muestras recolectadas se registraron correctamente con un código de identificación.

Los pacientes reclutados realizaron la lectura y firma del consentimiento informado que se encuentra en el anexo uno de este documento. El proyecto actual fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química.

Cepas.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron donadas por el laboratorio de enfermedades infecciosas de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, dirigido por la Dra. Carlota García Gutiérrez. Se trabajó con 5 cepas provienen de aislados clínicos de diferentes pacientes, por ultimo trabajamos con una cepa de referencia ATCC que no muestra resistencia farmacológica, en la tabla 5 se muestran las características de las cepas que utilizamos y el perfil de resistencia que mostraron las colonias.

6.2 Extracción y purificación de proteínas

Realizamos un raspado en placa de los cultivos de *A. baumannii*, para evitar la degradación proteolítica de las proteínas se añadió 500 µl de inhibidor de proteasa (1 mmol / L), las muestras se almacenaron a -20°C.

Para la extracción y purificación de proteínas usamos el kit ReadyPrep™ 2-D Cleanup, transferimos 100 µg de proteína muestra en un volumen final de 100 µl, agregamos 400 µl del agente precipitante 1 más 400 µl de agente precipitante 2 bajo condiciones de temperatura de -20°C y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 minutos para la formación de un granulado, se desechó el sobrenadante y se agregaron 40 µl de reactivo de lavado 1 y se centrifugo nuevamente, se retiró y desechó el agente de lavado, se agregó 1 ml de reactivo de lavado 2 (pre enfriado a -20 ° C durante 1 hora) y 5 µl del aditivo de lavado 2 y se incubaron a -20 ° C por 30 minutos, después se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. El granulo se dejó secar al aire a temperatura ambiente por 5 minutos y se resuspendió la muestra con 200 µl de buffer 2-D rehidratación (0.02g CHAPS + 0.21g UREA+ 0.0154g DTT) y se almaceno a -20°C.

6.3 Cuantificación Bradford

La cantidad de proteínas en la muestra fue analizada por el método colorimétrico de Bradford, para la determinación de la concentración de proteínas totales los resultados de absorbancia se colocaron en una curva de calibración usando proteína estándar albúmina de suero bovino (BSA). Para la curva estándar utilizamos siete diluciones en PBS de la proteína estándar BSA con un rango de 0.125 a 2 mg/ml (BioRad), donde se adicionaron 5 µl de cada dilución de BSA, por triplicado y 245 µl de reactivo Bradford en pozos de una placa de ELISA. Se colocaron en los pozos 5 µl de la muestra de proteínas más 245 µl de reactivo Bradford, se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se cuantificó por medio del lector de ELISA a 595nm.

6.4 Integridad de proteínas por Electroforesis 1 D SDS-PAGE

La determinación de la integridad de la muestra de proteínas se analizó por electroforesis en gel SDS PAGE, se realizó la preparación del gel separador al 12% (Agua destilada 1,6 mL, Acrilamida 30% 2.0 mL, Tris 1,5 M pH 8,8 1.3 mL, SDS 10% 0.05 mL, persulfato de amonio 10% 0.05 mL y TEMED 0.005 µL) y el gel concentrador al 4% (Agua destilada .68 mL, Acrilamida 30% 0.17 mL, Tris 1,5 M pH 6,8 0.13 mL, SDS 10% 0.01 mL, persulfato de amoniac 10% .01mL y TEMED .005µL). Las muestras se prepararon adicionando 10 µL de muestra más 3 µL de buffer de carga y se cargaron en pocillos consecutivos junto al marcador de peso molecular (PM) en el primer carril. La electroforesis se realizó por 1 hora a 100 V. Los geles se tiñeron durante 1 hora con azul de Coomassie G250 y se destiñeron con solución de desteñido (450 ml de metanol, 100 ml de Ácido acético y 450 ml dH₂O) al 7.5 % por 20 minutos. El gel se analizó utilizando un Sistema de Fotodocumentación UV (BioRad).

6.5 Electroforesis 2D

La electroforesis bidimensional se realizó usando el kit ReadyPrep™ 2-D Starter (BioRad).

Rehidratación de tiras IPG

Para la rehidratación usamos tiras IPG (gradiente de pH inmovilizado) de 7 cm, con un rango de pH de 3 a 10 y de un rango de pH menor de 4 a 7 para obtener una mayor resolución, las muestras se rehidrataron en 200 µl de buffer de rehidratación. Para la preparación de este buffer se utiliza: 0.02g CHAPS + 0.21g UREA+ 0.0154g DTT, en 500ml de inhibidor de proteasa, se adiciona azul de bromo fenol a la pastilla de 120X10 con 3 µl de anfolinas, y se tomaron 120 µl de proteínas muestra para hidratar la tira por 16 horas.

Isoelectroenfoque (IEF).

Para el enfoque isoeléctrico (IEF), se utilizó el equipo de Isoelectroenfoque: Protean IEF (BioRad) con tiras IPG de 7 cm, pH 4-7. El enfoque isoeléctrico se realizó aumentando gradualmente el voltaje (250 V por 0.5 h, 400 V por 1 h y 4000 V hasta alcanzar un total de 10000 kV/h), bajo las condiciones de 20 ° C y 50 µA. Posterior a la separación de IEF, las tiras se equilibraron durante 15 minutos en tampón de equilibrio (Tris-Cl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30% (v / v), SDS al 2% (p / v) y 0,002% azul de bromofenol). Se añadió DTT al 1% (DTT 15mg/ml 0.075g- 5ml) a la primera etapa de equilibrado, y 2,5% de IAA (IAA 37 mg/ml 0.187g-5ml) a la segunda.

2D SDS-PAGE

Después de la separación de proteínas por IEF, las tiras IPG se colocaron sobre un gel de poliacrilamida con resolución del 12% y se corrieron a 100 V durante 90 minutos. Para el análisis de proteínas se realizó el procedimiento indicado en el punto 6.4.

6.6 Preparación de alícuotas

Se trabajó con 199 muestras de suero, etiquetadas con un código de numeración del 100 al 299. Se prepararon alícuotas de cada muestra de 100 μ l cada una, respetando los número de etiquetas, se tomaron 3 alícuotas de cada muestra para los análisis inmunoproteómicos y la detección de anticuerpos. El resto de las muestras fueron almacenadas a -20°C .

Para los análisis inmunoproteómicos se trabajó con pool o mezclas de 50 sueros, se tomó una alícuota de cada muestra y se mezcló con 50 muestras de suero, obteniendo 4 pools. Cada pool fue probado con las membranas.

6.7 Detección de anticuerpos contra *A. baumannii*

Para la detección de anticuerpos en los sueros, trabajamos con las proteínas de *A. baumannii* cepa 1, 60 y ATCC previamente extraídas, las proteínas se separaron en un gel preparativo por electroforesis SDS-PAGE al 12%, obteniendo proteínas resueltas en una dimensión de forma lineal alrededor de todo el gel, posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 mm (Bio-Rad) durante 20 minutos a 100 V en cámara semi- húmeda (BioRad). Las membranas se cortaron en tiras de 5 mm, cada tira se incubó con los sueros individuales con el código correspondiente de 250-299 del pool 4, se incubaron toda la noche a 4°C en agitación lenta, posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS-Tween al 1% y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-Human Anti-IgG-HRP preparado en una dilución de 1:3000, por último se realizaron 10 lavados de 5 minutos con PBS-Tween al 1% a temperatura ambiente y se reveló por quimioluminiscencia.

6.8 Inmunotransferencia.

Las proteínas separadas fueron transferidas de los geles bidimensionales a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 mm (Bio-Rad) durante 20 minutos a 100 V en cámara semi- húmeda (BioRad). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% y albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS (Tris-HCl 25

mM, pH 8.0; NaCl 0,15 mM) a temperatura ambiente durante 30 minutos y después a -4°C por toda la noche. Posteriormente las membranas se lavaron tres veces durante 5 min con PBS-Tween al 1%. Las membranas se incubaron durante 24 horas con el mix de sueros a -4°C, posteriormente realizamos 5 lavados de 15 minutos con PBS-Tween al 1% y se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-Human Anti-IgG-HRP preparado en una dilución de 1:3000, por último se realizaron 10 lavados de 5 minutos con PBS-Tween al 1% a temperatura ambiente y se reveló por quimioluminiscencia.

6.9 Caracterización de proteínas

A partir de los spots detectados en los análisis inmunoproteómicos, realizamos una identificación teórica basada en una búsqueda bibliográfica de las proteínas identificadas como candidatos a vacuna contra *A. baumannii* de los últimos años. La detección de proteínas se realizó de acuerdo a la coincidencia con las propiedades fisicoquímicas. Recuperamos la secuencia de aminoácidos de cada proteína detectada, usando el banco de datos del GenBank. A partir de estos resultados realizamos el alineamiento de secuencias y estimamos el punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (PM) de cada proteína por el programa ExPASy. La determinación de sus características como presencia de dominios, localización celular, estructura tridimensional y funciones biológicas se determinaron por diferentes programas incluidos: MASCOT, UniProt, Protscale Expasy, ScanProsite.

Los análisis de predicción de epítomos de células B se basaron en el software ABCpred el cual se centra en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Todas las predicciones reportadas en este ensayo mostraron una puntuación de predicción mayor o igual a 0.6, con la finalidad de obtener datos significativos.

La estructura 3D de las proteínas y la predicción de epítomos basado en esta estructura se realizó mediante el uso de un banco de datos de proteínas (PDB) y DiscoTop.

7. Resultados

7.1 Características de las cepas de *Acinetobacter baumannii*

Las cepas utilizadas en este estudio provienen de aislados clínicos de diferentes pacientes, en la tabla 5 se muestran las características de las cepas que utilizamos y el perfil de resistencia que mostraron las colonias, según los análisis llevados a cabo en el laboratorio de enfermedades infecciosas de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, dirigido por la Dra. Carlota García Gutiérrez. Las colonias muestran resistencia a antibióticos de amplio espectro y de espectro reducido. La cepa 1 y 2 muestran resistencia al Doripenem que es un antibiótico de tipo carbapenémicos, además se muestra resistencia a la Colistina, considerado uno de los antibióticos usados como última instancia para tratar infecciones poli-resistentes contra *A. baumannii*.

Tabla 5: Características de las cepas de *A. baumannii*

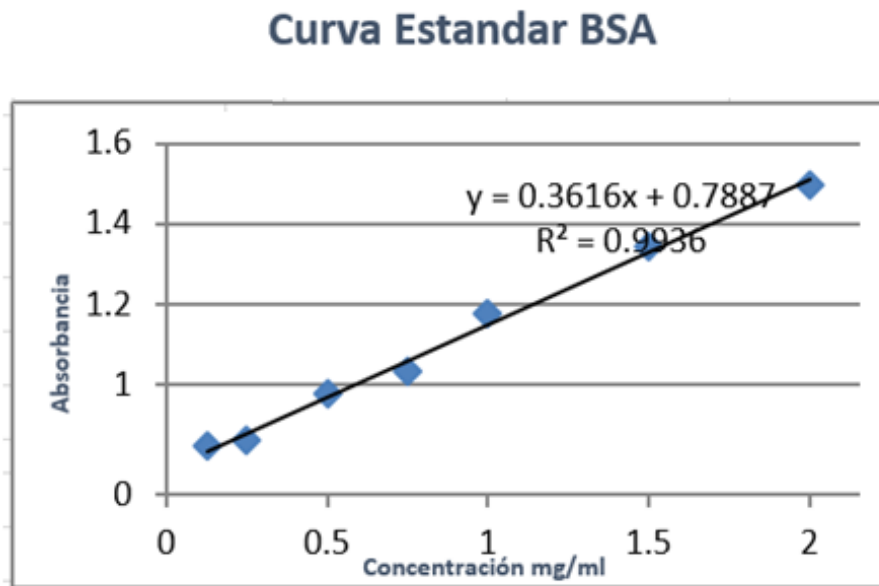
Cepa	Aislado clínico	Perfil de resistencia
<i>Acinetobacter baumannii</i> 1	Secreción bronquial Terapia Intensiva Neonatal	Amikacina, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Imipenem, Meropenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Netilmicina, Tobramicina, Ticarcilina-Ácido Clavulánico, Doripenem, Cefotaxima, Colistina.
<i>Acinetobacter baumannii</i> 2	Sangre periférica Terapia Intensiva Neonatal	Ampicilina-Sulbactam, Amikacina, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Imipenem, Meropenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Netilmicina, Tobramicina, Ticarcilina-Ácido Clavulánico, Doripenem, Cefotaxima, Colistina
<i>Acinetobacter baumannii</i> 56	Secreción de herida Medicina interna	Amikacina, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Piperacilina-Tazobactam.
<i>Acinetobacter baumannii</i> 60	Punta de catéter	Amikacina, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Piperacilina-Tazobactam.

<i>Acinetobacter baumannii</i> 61	Secreción bronquial Terapia Intensiva de Adultos	Amikacina, Ampicilina-Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Piperacilina-Tazobactam.
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC	Cepa de referencia	No es resistente

7.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Posterior a la extracción de proteínas de las 6 cepas de *A. baumannii* se realizó la cuantificación por el método colorimétrico de Bradford. Para determinar la concentración de proteínas en las muestras extraídas previamente, se realizó una curva de calibración usando BSA con los estándares de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL; medidos por triplicado, la curva estándar arrojó un valor $r^2=0.99$ (figura 7).

Figura 7: Curva estándar para la cuantificación de proteínas de Ab1 y 2



En la tabla 6 se muestran los resultados de absorbancia para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras de *Acinetobacter baumannii* 1, 2, 60, 56 y 61 respectivamente, según la ecuación $x = (y-b) / m$. La concentración de las muestras fue de 0.8145, 1.3129, 0.7790, 0.3661, y 0.5193 mg/mL respectivamente, posteriormente se calculó la concentración que había por muestra en 100 μ g, ya que el protocolo establece que requerimos muestras con una concentración de 100 μ g en 125 μ l.

Tabla 6: Concentración de las muestras de proteínas

Muestra	Absorbancia 595 nm	Concentración mg/mL	μl por Tira IPG (100μg)
<i>A. baumannii</i> 1	1.0255	0.81451613	123 μl
<i>A. baumannii</i> 2	1.18	1.31290323	76 μl
<i>A. baumannii</i> 60	1.0145	0.77903226	125 μl
<i>A. baumannii</i> 56	0.8865	0.36612903	270μl
<i>A. baumannii</i> 61	0.934	0.51935484	190μl

Estos resultados sugieren que las muestras de *A. baumannii* 1, 2 y 60 muestran una concentración suficiente para la separación por electroforesis bidimensional (2D).

7.3 Integridad de proteínas

Una vez realizada la cuantificación de proteínas, se realizó el análisis de integridad mediante electroforesis unidimensional SDS- PAGE, de las muestras de proteínas de las cepas de *A. baumannii* 1, 2 56, 60 y 61 respectivamente (Figura 8). Los resultados mostraron la presencia de bandas integras correspondientes a proteínas de alto y bajo peso molecular, en todas las muestras analizadas. Estos resultados sugieren que las muestras de extracto total de proteínas están íntegras y pueden ser utilizadas en la separación por electroforesis 2D.

Figura 8: Análisis de integridad de las muestras Ab 56, 61, 60, 1 y 2.

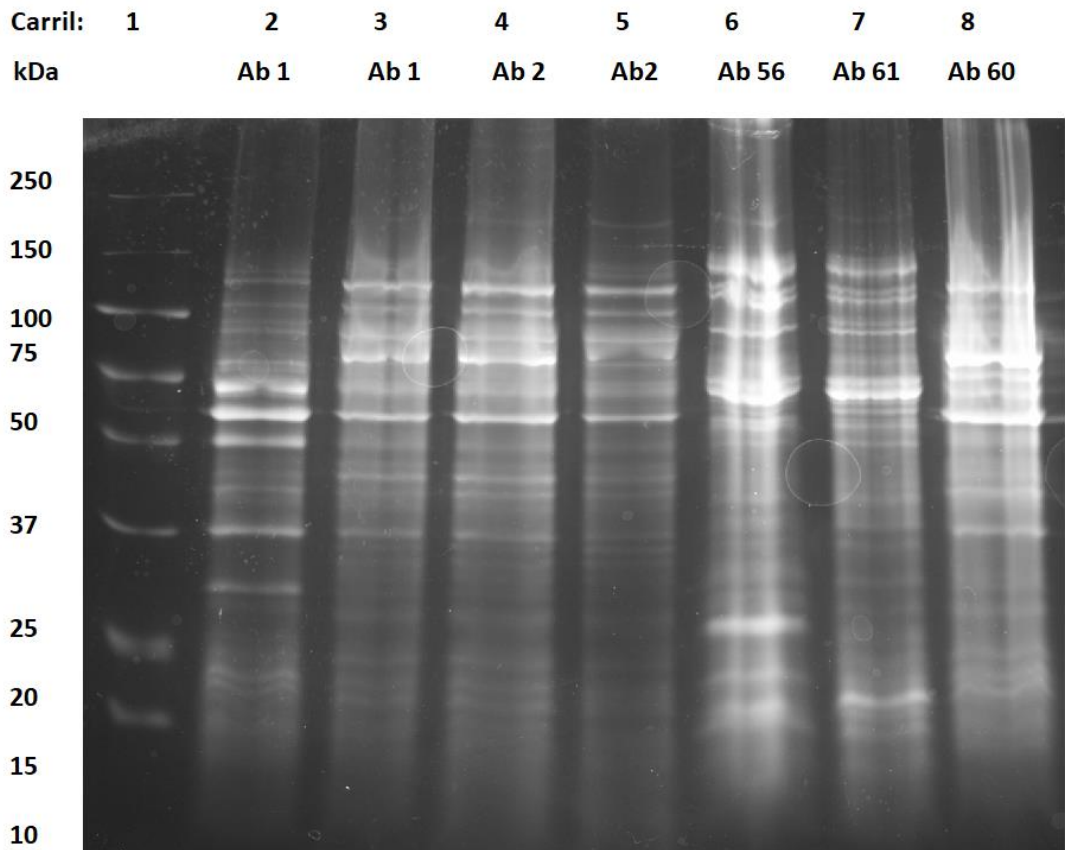


Figura 8: Análisis de integridad de las muestras de proteínas de *Acinetobacter baumannii* por electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-SDS teñido con azul de coomassie. En el primer carril el marcado de peso molecular, en los carriles consecutivos observamos las muestras de *Ab*. Carriles: Carril1: Marcador, carril 2: cepa Ab 1, carril 3: cepa Ab1, carril 4: cepa Ab 2, carril 5: cepa 2, carril 6: cepa 56, carril 7: 60, carril 8: cepa60.

Figura 9: Análisis de integridad y cuantificación de la cepa ATCC

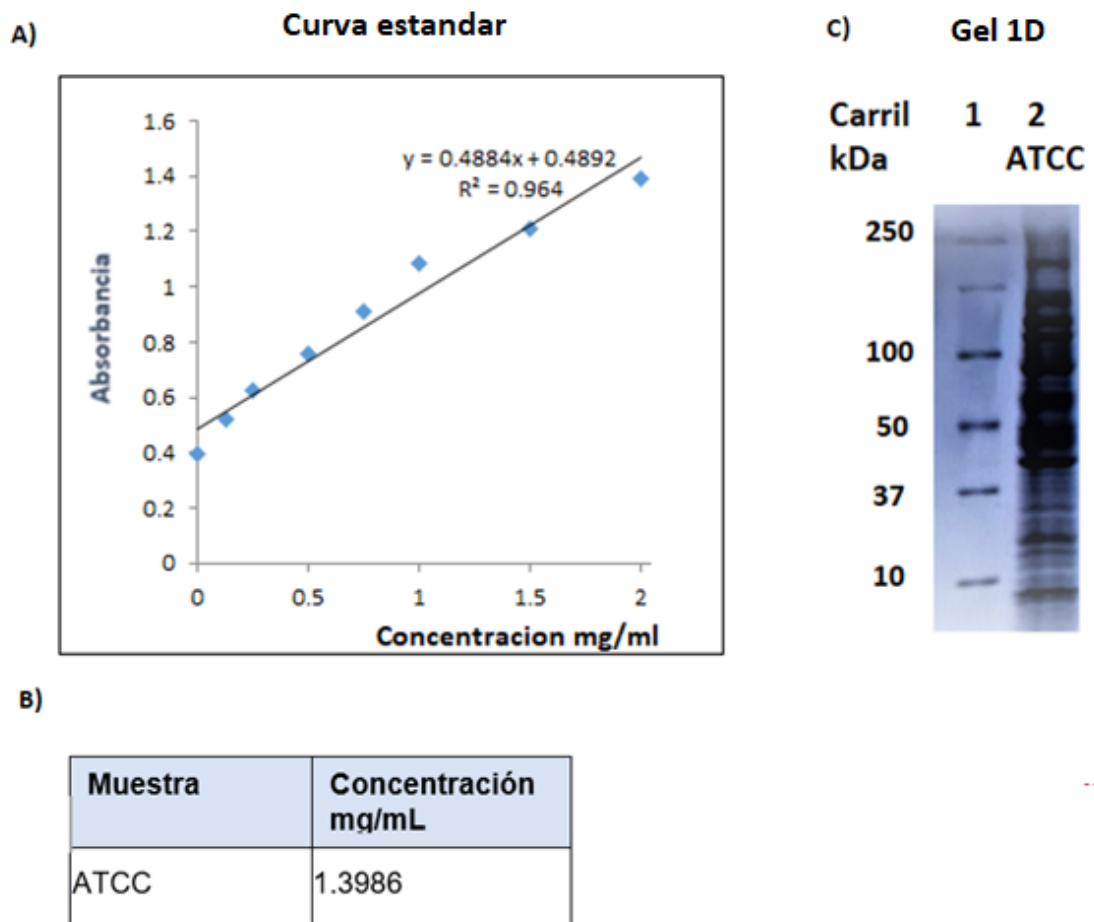


Figura 9: A) Curva estándar para la cuantificación de la cepa de *A. baumannii* ATCC. $R^2 = 96\%$. B) Concentración calculada de la cepa ATCC. C) Análisis de integridad de la muestra de proteínas de *A. baumannii* ATCC por electroforesis en gel PAGE-SDS. En el primer carril el marcado de peso molecular, carril 2: Cepa ATCC.

7.4 Proteoma de *Acinetobacter baumannii* por electroforesis 2D

Para la obtención del proteoma de *Acinetobacter baumannii* cepa 2 realizamos la separación de proteínas por electroforesis bidimensional, usamos tiras IPG de 7 cm con un rango de gradiente de pH inmovilizado de 3-10 que permitió que las proteínas sean separadas de acuerdo a su punto isoeléctrico en una primera dimensión, para la separación en segunda dimensión las proteínas enfocadas fueron separadas de acuerdo al peso molecular en un gel de poliacrilamida al 12%. Los análisis se realizaron por duplicado, uno de los gels fue teñido con azul de Coomassie G-250 (Figura 10) y el otro gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para el ensayo inmunoproteómico.

En la figura 10 se presenta la imagen del gel 2D representativo de la muestra *A. baumannii* 2 ya que los análisis de integridad y concentración nos mostraron que es una muestra óptima. En los resultados del gel 2D observamos spots que corresponden a las proteínas separadas entre 250 a 10 kDa con un punto isoeléctrico de un rango variable de pH entre 4 a 7.

Figura 10: Gel 2D de *A. baumannii*

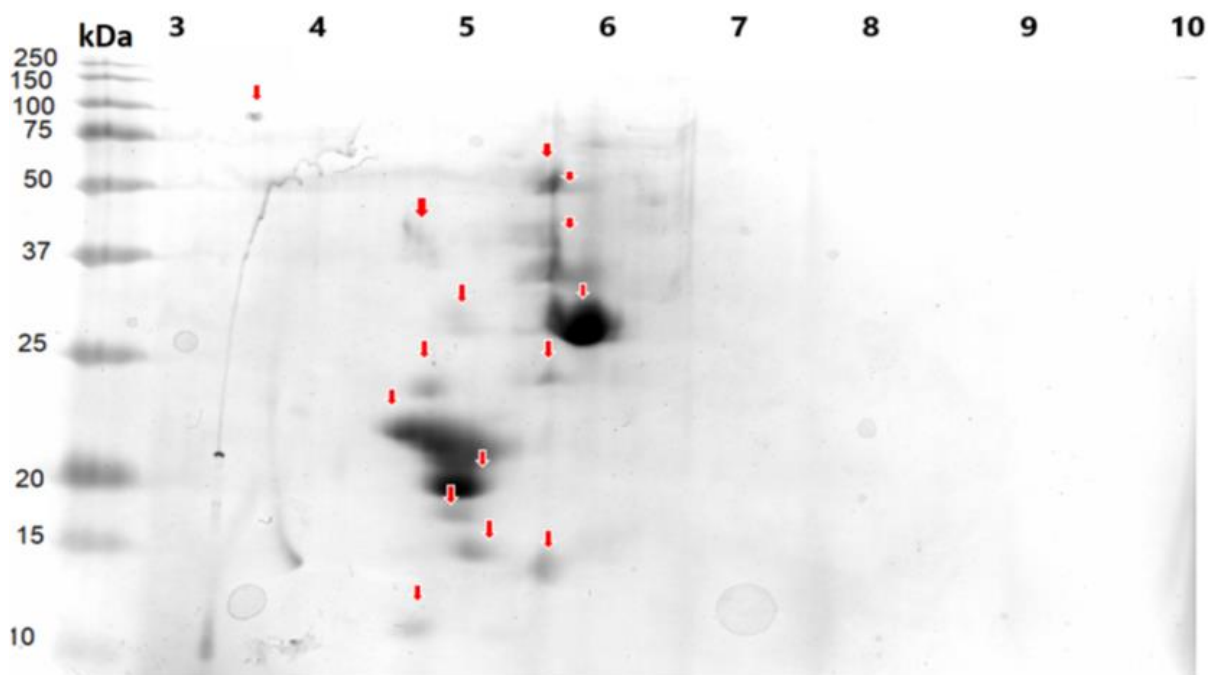


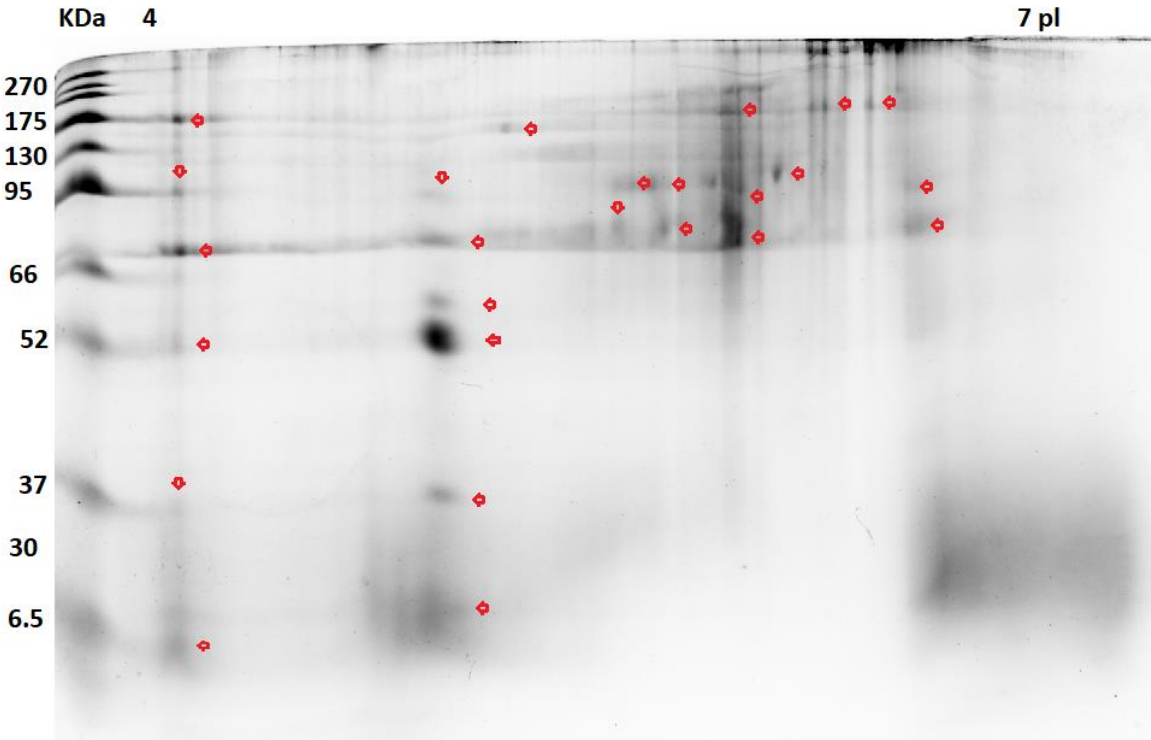
Figura 10. Análisis proteómico de *Acinetobacter baumannii*. Gel bidimensional del análisis proteómico de la muestra *Ab 2*. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular. Las proteínas se separaron horizontalmente de acuerdo a su punto isoeléctrico y de forma vertical de acuerdo a su peso molecular. Flechas rojas indican los spots.

Con base a los resultados obtenidos del gel previo, se tomó la decisión de mejorar la resolución de proteínas, se trabajó con tiras IPG de con un rango de pH menor de 4-7 (Figura 9 a y b). En los geles bidimensionales se analizó el extracto total de proteínas de las cepas que mostraron un perfil de bandeo y resistencia diferencial, por lo cual seleccionamos las cepas de *A. baumannii* 1 y *A. baumannii* 60. con la finalidad de obtener el perfil proteómico de cada cepa.

La figura 11 muestra los geles bidimensionales en donde se observa la presencia de manchas que corresponden a las proteínas separadas entre 270 a 10 kDa con un punto isoeléctrico de un rango variable de pH entre 4 a 7.

Figura 11: Análisis proteómico de *Acinetobacter baumannii*

a)



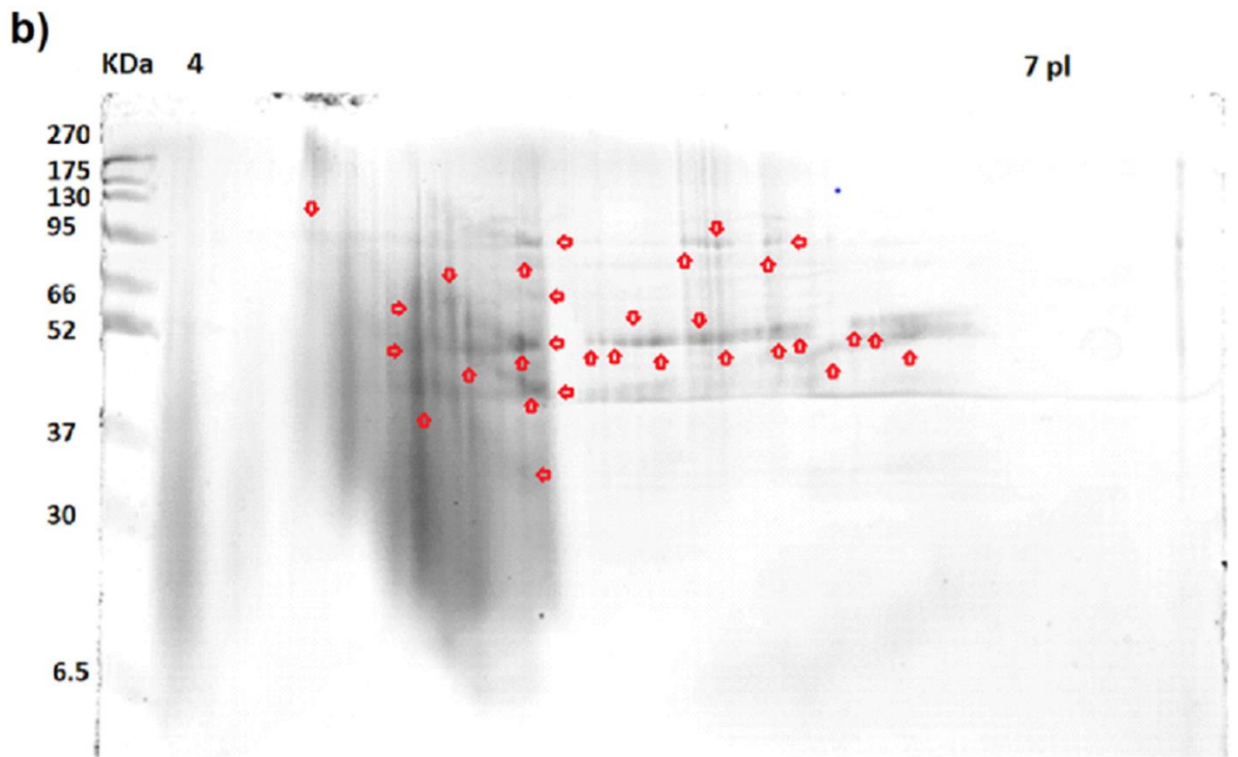


Figura 11: Mapa proteómico del extracto total de proteínas de *A. baumannii* muestra. a) Análisis bidimensional de la cepa Ab 1. b) Análisis bidimensional de la cepa Ab 60. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie G-250. Las puntas de flecha indican los spots obtenidas en el análisis proteómico. En el lado izquierdo se observa el marcador de peso molecular. Las proteínas se separaron horizontalmente de acuerdo a su punto isoeléctrico y de forma vertical de acuerdo a su peso molecular.

7.5 Inmunodetección de proteínas de *Acinetobacter baumannii* en sueros expuestos.

Para la obtención del inmunoproteóma, se analizaron 199 sueros de personas con antecedentes de estancias hospitalarias, debido a que podrían haber estado expuestos a una coinfección con *A. baumannii*. Los 199 sueros se trabajaron en pools o mezcla de 50 sueros, obteniendo en total 4 pools.

Para determinar la presencia de anticuerpos en las muestras de suero, se realizó la separación de proteínas, previamente extraídas de la cepa 1 en un gel preparativo SDS-PAGE al 12%, las proteínas en el gel fueron trasferidas a una membrana de nitrocelulosa de 45 mm, las membranas se cortaron en tiras de 5 mm para después incubar cada tira con los 4 pools posteriormente se incubo con Anti-Human Anti-IgG-HRP (Peroxidasa de rábano picante) y se reveló por quimioluminiscencia. En los resultados se observa la presencia de bandas en las cuatro tiras, que corresponden a las proteínas inmunoreactivas unidas a los anticuerpos (Figura 12), estos resultados sugieren que en los 4 pools están presentes muestras con anticuerpos contra *A. baumannii* por lo tanto podrán ser utilizados para el análisis inmunoproteómico en los geles bidimensionales, sin embargo, el pool 4 mostró una mayor respuesta.

Figura 12: Detección de anticuerpos contra *A. baumannii* por Western blot.

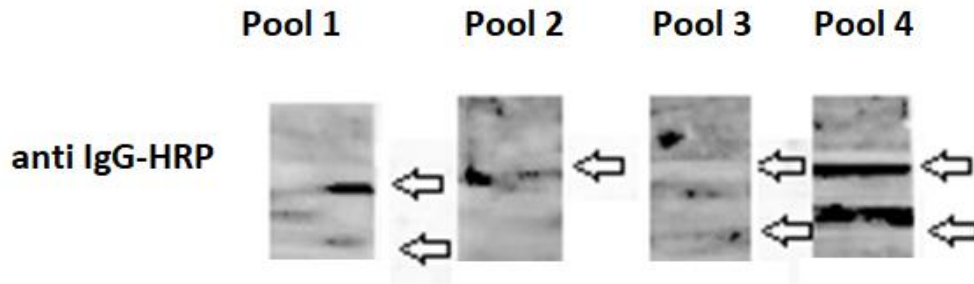
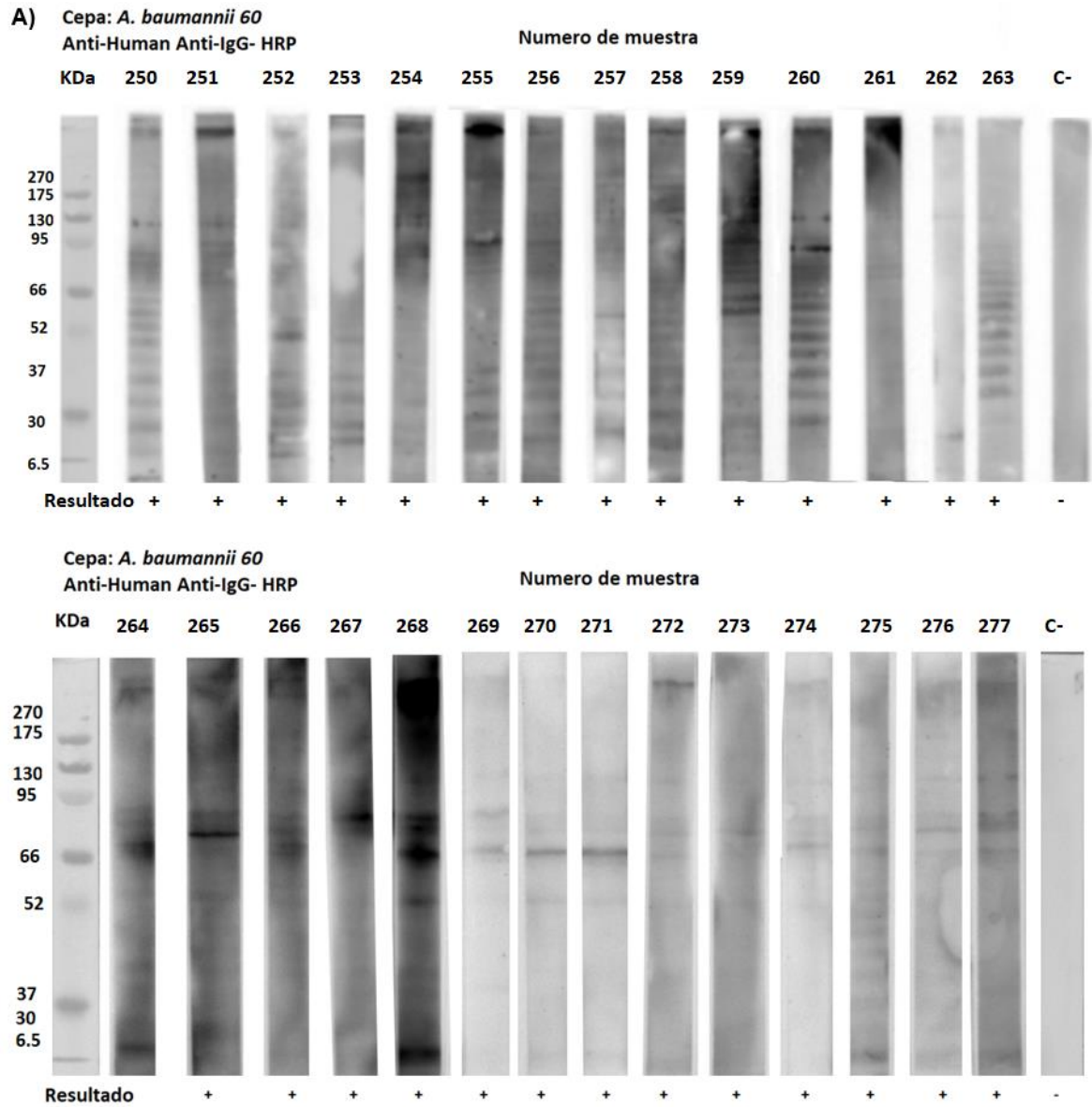


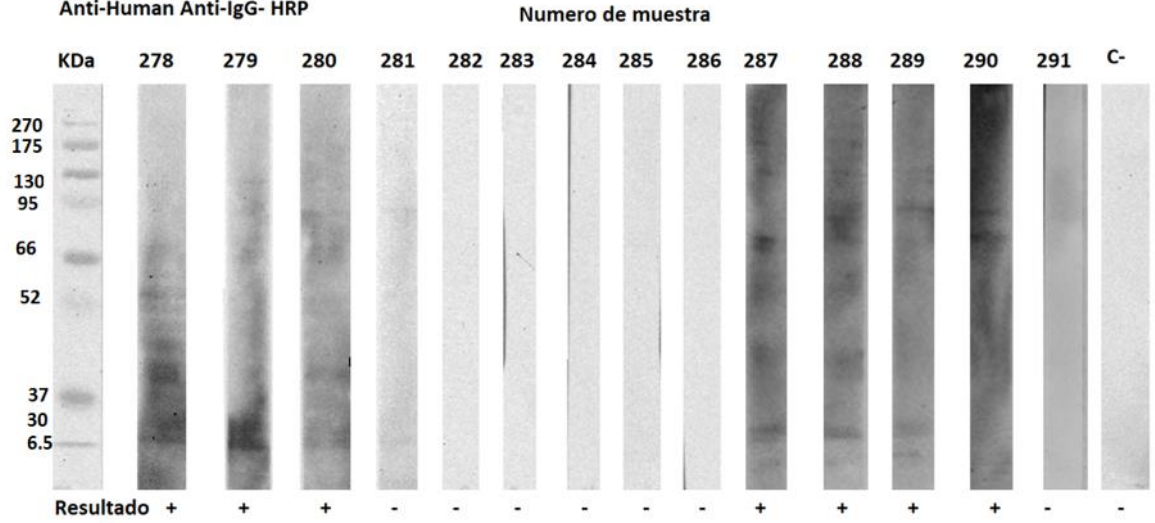
Figura 12: Las proteínas trasferidas a la membrana se incubaron con los pools de sueros, carril 1: membrana incubada con el pool 1, carril 2: membrana incubada con el pool 2, carril 3: membrana incubada con el pool 3 y carril 4: membrana incubada con el pool 4.

Para los análisis posteriores seleccionamos el pool 4 ya los resultados anteriores mostraron mayor respuesta. Los cincuenta sueros del pool 4 fueron analizados por inmunotransferencia con proteínas que se resolvieron en geles 1-D para determinar la frecuencia de aparición de las principales proteínas inmunogénicas en un suero individual y con la finalidad de determinar la presencia de anticuerpos en cada muestra. Las proteínas se obtuvieron, previamente, de las cepas 1, 60 y ATCC (seleccionados de acuerdo a las diferencias en el perfil de resistencia), las cuales se separaron en geles preparativos SDS-PAGE al 12%, por separado. Las proteínas en el gel fueron trasferidas a una membrana de nitrocelulosa y se cortaron en tiras de 5 mm para después incubar cada tira por separado con cada uno de los 50 sueros, de igual forma se incubo con Anti-Human Anti-IgG-HRP y se reveló por quimioluminiscencia, una parte del gel fue cortada y se tiño con azul de Coomassie G250 (Figura 13).

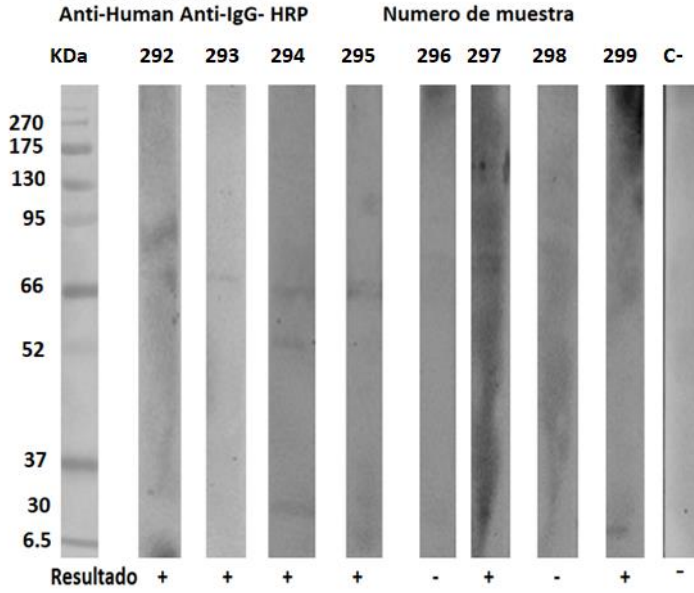
Figura 13: Detección de anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* 60 por Western blot



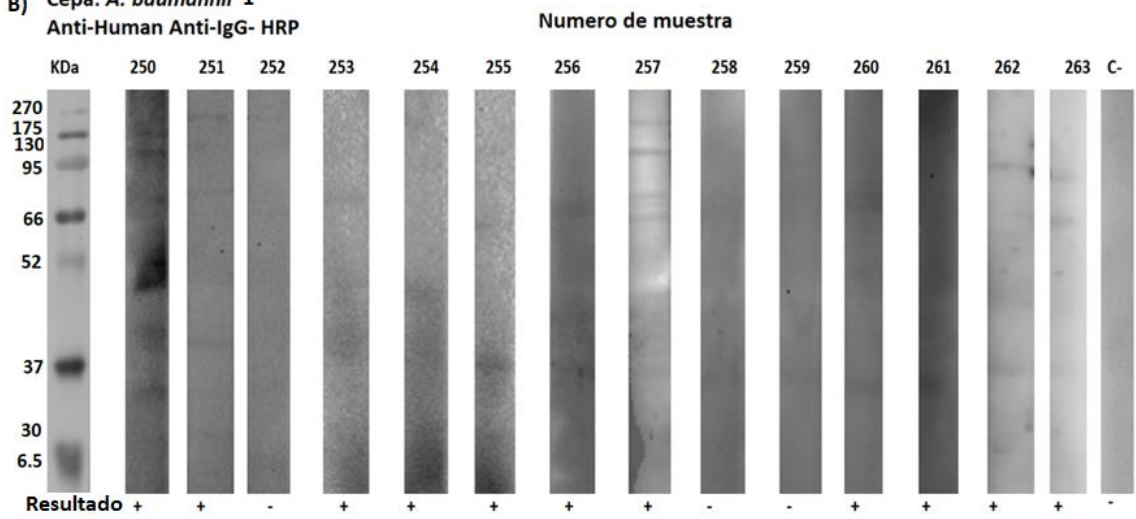
Cepa: *A. baumannii* 60
Anti-Human Anti-IgG- HRP



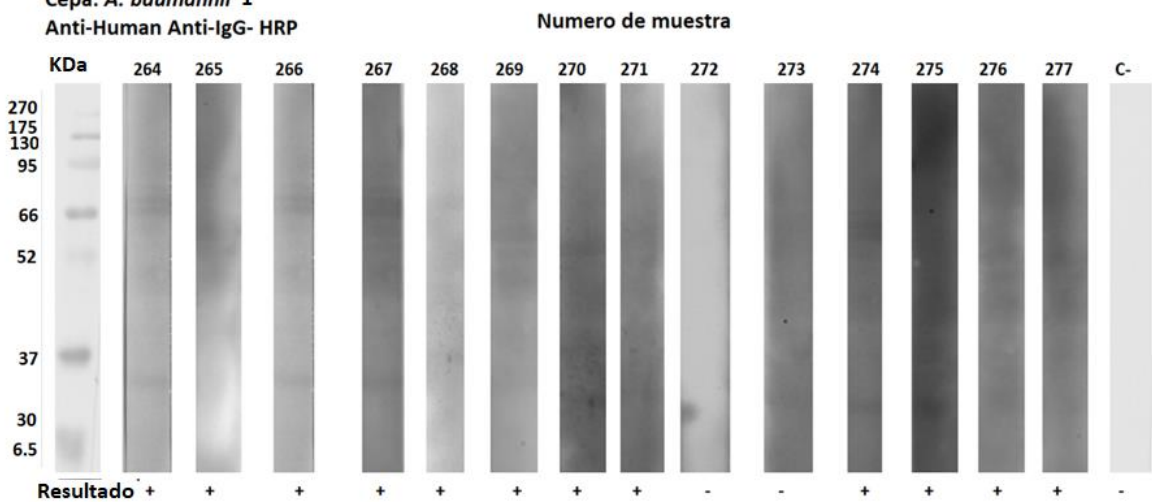
Cepa: *A. baumannii* 60
Anti-Human Anti-IgG- HRP

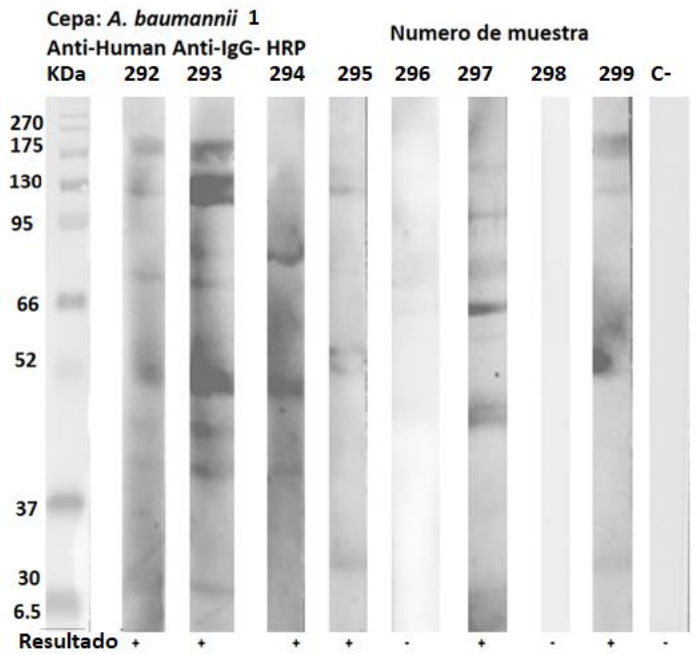
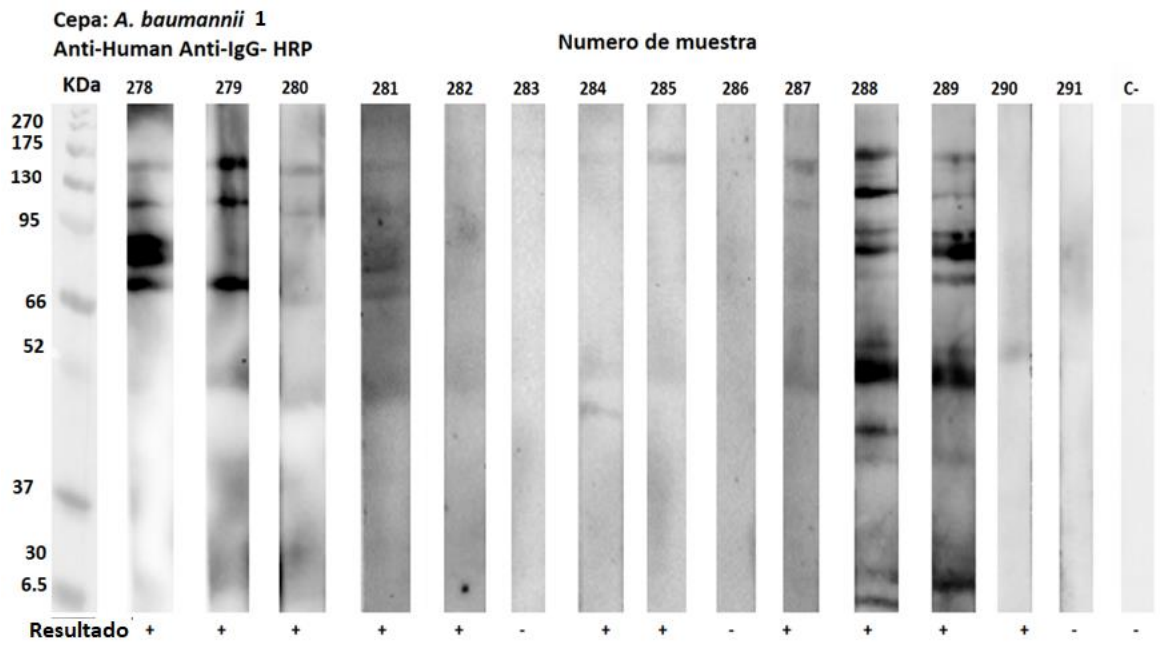


B) Cepa: *A. baumannii* 1
Anti-Human Anti-IgG- HRP

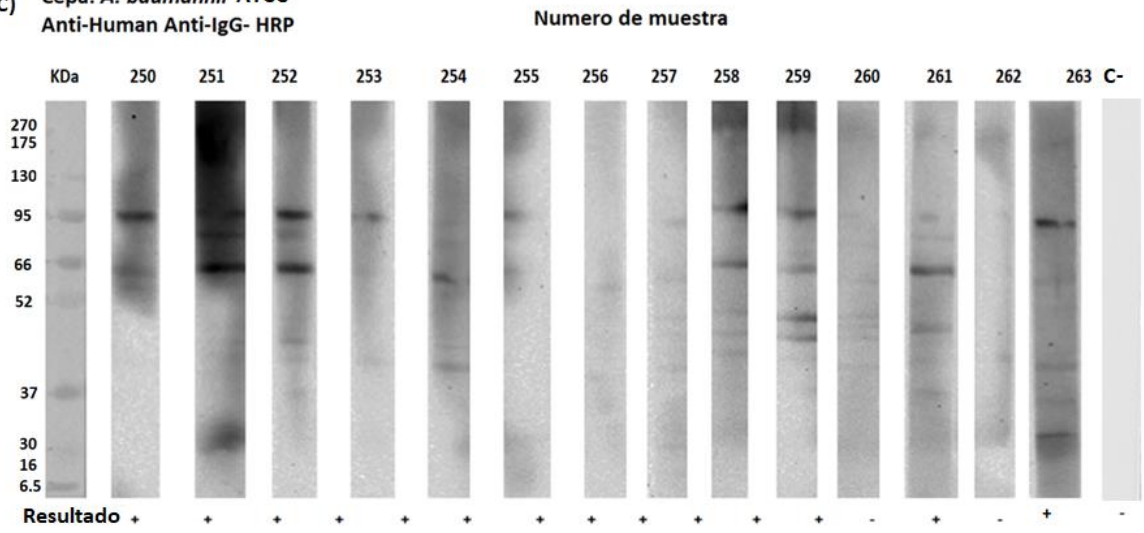


Cepa: *A. baumannii* 1
Anti-Human Anti-IgG- HRP

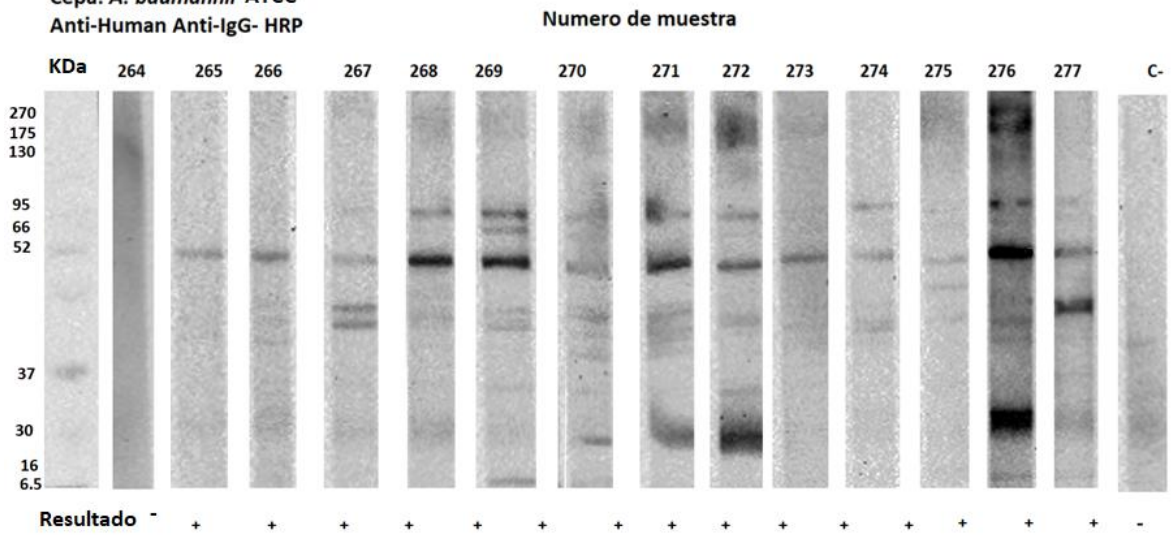




C) Cepa: *A. baumannii* ATCC
Anti-Human Anti-IgG- HRP



Cepa: *A. baumannii* ATCC
Anti-Human Anti-IgG- HRP



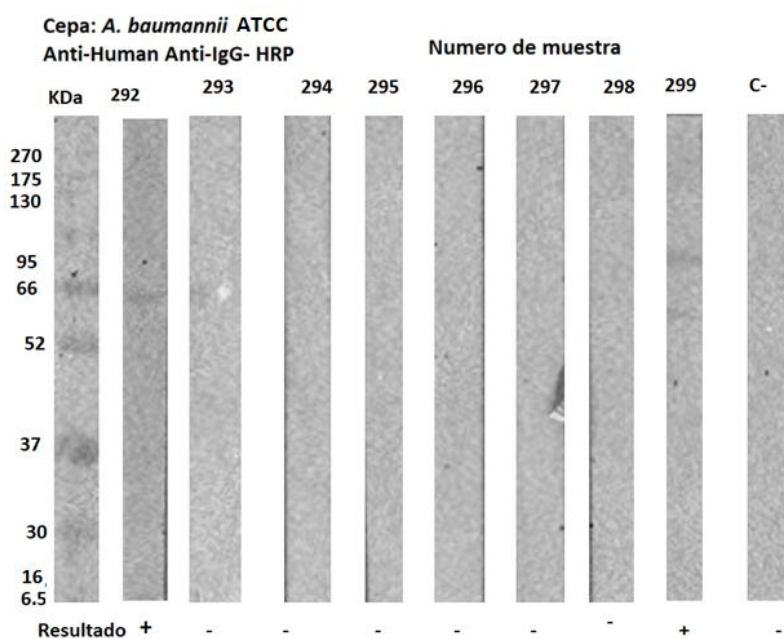
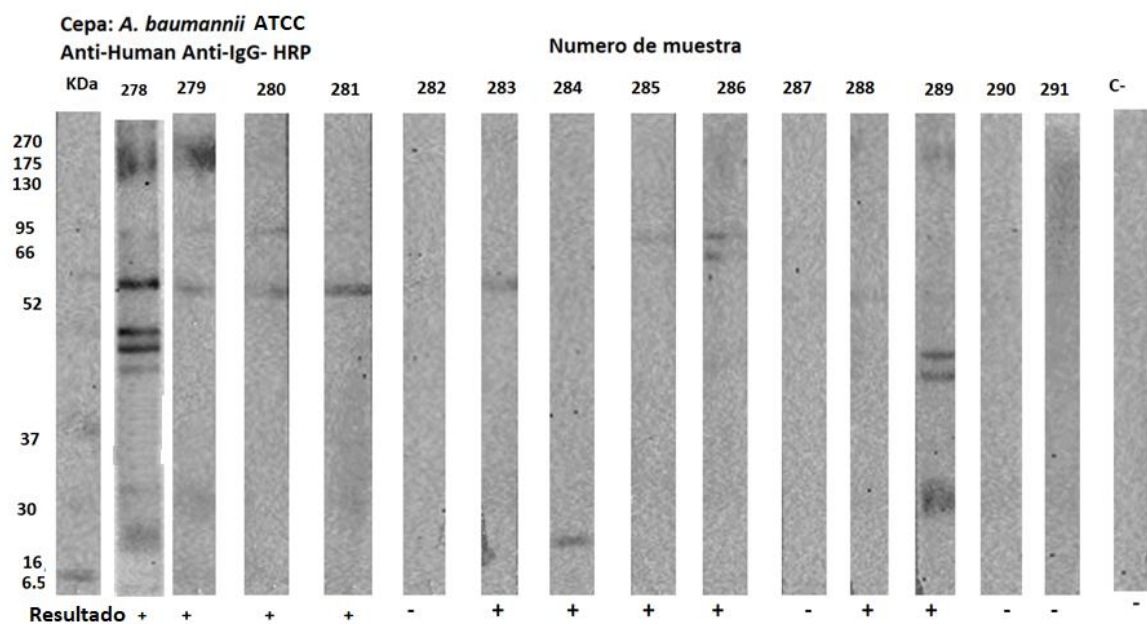


Figura 13. Detección de anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* por Western blot. Las proteínas fueron transferidas a la membrana cortada en tiras de 5mm, cada tira se incubó con la muestra de suero correspondiente con etiqueta de 250-299, C- : Control negativo, incubado con PBS. Resultado +; corresponde a tiras donde se observa la presencia de bandas. Resultado -; no se observa la presencia de bandas.

A) Detección de anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* 1. Figura B) Detección de anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* 60. C) Detección de anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* ATCC.

Nuestros resultados mostraron que del total de sueros analizados el 84% mostró anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* 1 (Figura 14 A) con resistencia a; Amikacina, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Imipenem, Meropenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Netilmicina, Tobramicina, Ticarcilina-Ácido Clavulánico, Cefotaxima, Doripenem que es un antibiótico de tipo carbapenémicos y la Colistina que es un antibiótico utilizado de última instancia para tratar infecciones panresistentes (PDR) contra *A. baumannii*. El 82% de los sueros contiene anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* 60 (Figura 14 B) esta cepa muestra resistencia antibióticos de amplio espectro como de espectro reducido que incluyen; Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Piperacilina-Tazobactam. Y por último el 76% de los sueros mostró anticuerpos contra la cepa de referencia ATCC sin resistencia.

Por otra parte, el 66% (33/50) de los sueros mostró los mismos resultados en las 3 cepas analizadas, de estos, el 87.8% (29/33) reportaron resultados positivos y el 12.1% (4/33) resultados negativos en todas las cepas. El otro 34% (17/50) de sueros mostró variabilidad en los resultados, es decir, en algunas cepas observamos claramente la presencia de bandas mientras que los análisis en otras cepas no mostraron la presencia de bandas o bien las bandas no se observaron con tanta claridad.

Figura 14: Frecuencia de proteínas inmunogénicas.

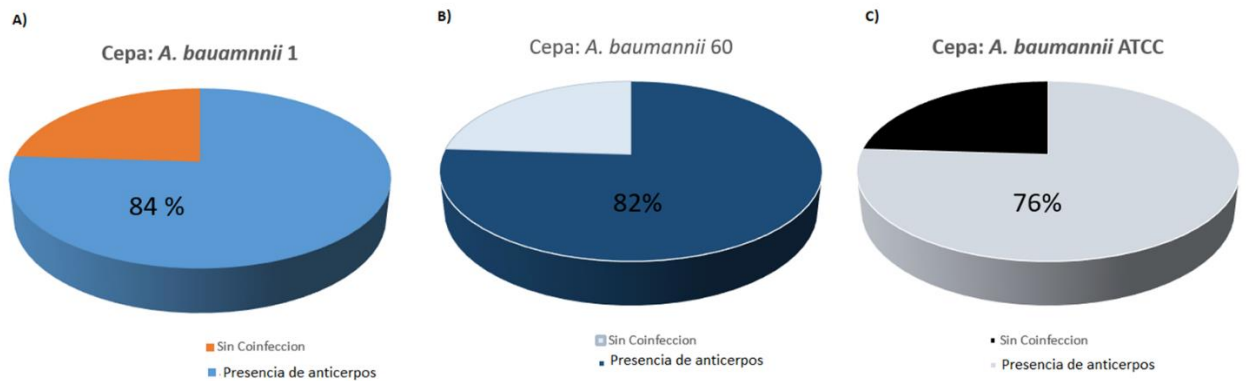


Figura 14. Grafica del análisis de frecuencia de la presencia de proteínas inmunogénicas en las cepas 1, 60 y ATCC. A) Cepa 1, porcentaje de la presencia de anticuerpos 84%. B) Cepa 60, porcentaje de la presencia de anticuerpos 82% C) Cepa ATCC, porcentaje de la presencia de anticuerpos 76%.

7.6 Inmunoproteoma de *Acinetobacter baumannii*.

Para la detección de proteínas inmunogénicas, en geles bidimensionales, se realizó un análisis inmunoproteómico mediante western blot. Las membranas obtenidas a partir de los geles bidimensionales se incubaron con los 4 pool de sueros, mezclados en un solo pool, ya que según los resultados mostrados de la figura 12, todos los pool muestran resultados positivos para la presencia de anticuerpos contra *A. baumannii*, posteriormente se incubó con Anti-Human Anti-IgG-HRP y se reveló por quimioluminiscencia.

En los resultados obtenidos se observa únicamente la presencia de spots que corresponden a proteínas que interactúan con los anticuerpos presentes en los sueros, es decir proteínas inmunogénicas.

Los resultados obtenidos de cada membrana se compararon con los geles bidimensionales teñidos con azul de Coomassie G-250 por el software PDQuest. Se detectaron un total de 15 spots que corresponden a las proteínas inmunogénicas (Figura 15 y 16).

Figura 15: Inmunoproteóma de *Acinetobacter baumannii* cepa 1.

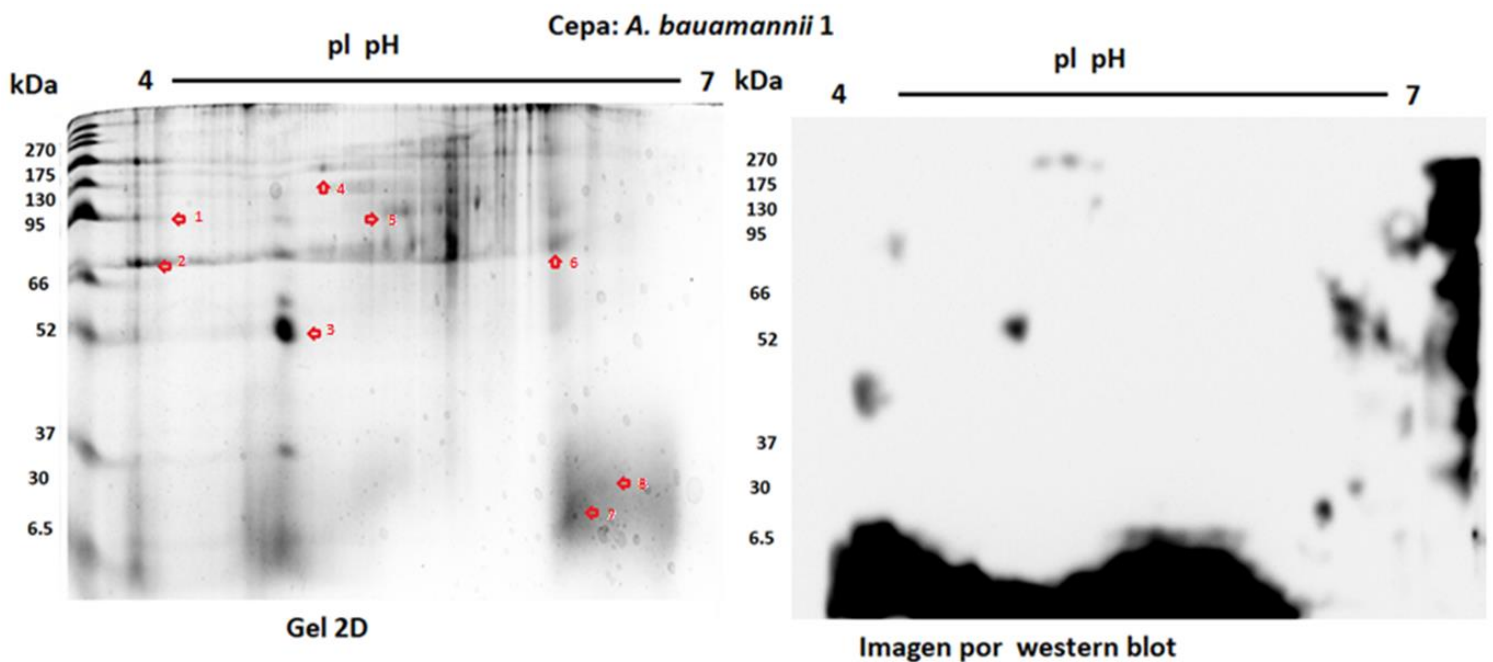


FIGURA 15 Inmunoproteóma de *Acinetobacter baumannii* 1 A) Gel bidimensional del análisis proteómico de la muestra Ab 1 teñido con azul de Coomassie G-250 **B)** Imagen del análisis de inmunotransferencia de la muestra Ab 1. Se detectaron 8 spots, enumerados del 1-8

Figura 16: Inmunoproteóma de *Acinetobacter baumannii* cepa 60.

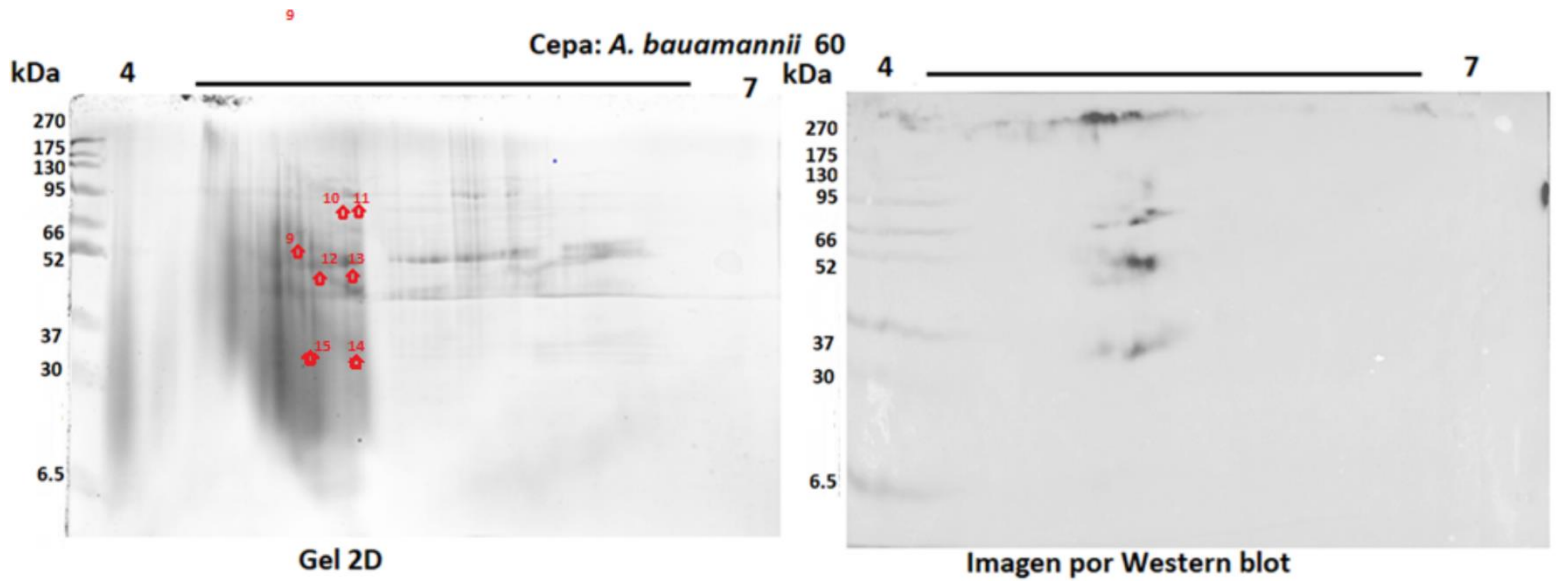


FIGURA 16 Inmunoproteóma de *Acinetobacter baumannii* A) Gel bidimensional del análisis proteómico de la muestra Ab 60 teñido con azul de Coomassie G-250 B) Imagen del análisis de inmunotransferencia de la muestra Ab. 60. Se detectaron 7 Spots enumerados del 14-20.

7.7 Análisis *in silico* de proteínas inmunogénicas

Con los resultados obtenidos en los ensayos inmunoproteómicos, se realizó una identificación teórica de proteínas basada en la búsqueda bibliográfica de proteínas reportadas como candidatos a vacuna en *A. baumannii* de los últimos años. La identificación teórica se centró en un análisis comparativo, respecto a la coincidencia de las características fisicoquímicas que nuestros análisis inmunoproteómicos reportaron (pI y PM) y las descritas en la base de datos.

Realizamos la búsqueda bibliográfica de proteínas reportadas en los últimos 20 años como candidatos a vacuna contra *A. baumannii* por diversos autores. Posteriormente realizamos un análisis comparativo de los 15 spots detectados de los geles bidimensionales (Figura 15 y 16) comparadas con las proteínas ya reportadas como candidatos a vacuna, a partir de la coincidencia por punto isoeléctrico y talla molecular estimada. Recuperamos la secuencia de aminoácidos de cada proteína detectada, usando el banco de datos del GenBank realizamos la estimación del pI y PM de cada proteína por el programa ExPASy. Posteriormente realizamos la determinación de sus características como presencia de dominios, localización celular, estructura y funciones celulares a partir de diferentes programas incluidos MASCOT, la base de datos UniProt y MvirDB una base de datos para la identificación de factores de virulencia.

De los 15 spots que detectamos como proteínas inmunogénicas, los análisis comparativos nos permitieron identificar teóricamente 8 de ellos, a partir de las coincidencias respecto al pI y PM. En la tabla 7 se muestra el spot detectado y la proteína sugerida a partir de nuestros análisis.

Como perspectiva del presente trabajo, se pretende identificar por espectrometría de masas, las proteínas inmunodetectadas y verificar su identidad.

Tabla 7: Análisis *in silico* de proteínas inmunogénicas.

Spot	Proteína	PM	pl	Núm. de a.a.	GenBank	Función	Referencias
1	BamA	93,77 8.09	5.26	841	AXV5206 7.1	Ensamblaje de proteínas de la membrana externa.	(Singh <i>et al.</i> , 2017)
2	OprC	77,98 6.16	5.84	704	ADX0183 4.1	Porina selectiva de carbohidratos (transporte de glucosa, manitol, glicerol y fructosa). Mantenimiento de la integridad estructural, conjugación bacteriana, unión de bacteriófagos, resistencia y formación de poros.	(Fajardo <i>et al.</i> , 2014)
4	Bpl1 o BapA	344,4 00.21	4.11	3163	WP_1266 55828.1	Formación de biopelículas y adhesión a células epiteliales	(Skerniškytė <i>et al.</i> , 2019)
6	FilF	70,86 1.69	6.27	649	ATU2195 9.1	Utilizada durante el transcurso del ensamblaje del pilus	(Singh <i>et al.</i> , 2016)
7	OprF	20,36 8.31	7.54	180	KZA5504 6.1	Porina que participa en la virulencia bacteriana y transporte de moléculas.	(Bahey <i>et al.</i> , 2020)

8	Oxa-23	30,97 8.86	7.71	273	ABK3477 5.1	Resistencia a carbapenémicos, beta-lactamasa OXA-23.	(Carvalho <i>et al.</i> , 2009) (Fajardo <i>et al.</i> , 2014)
14	OmpA	38,44 9	5.32	356	SSM8774 3.1	Adhesión al tejido epitelial, inducción de apoptosis y diferenciación de células inmunes.	(Luo G. <i>et al.</i> , 2012) (Zhang X. <i>et al.</i> , 2016)
15	MotB	37,73 0.41	5.06	347	SST0708 0.1	Motilidad celular	(Hassan <i>et al.</i> , 2016)
-	Bap	307,5 46.78	3.21	3135	QWN433 15.1	Formación de biopelículas y adhesión a células epiteliales	(Fattahian <i>et al.</i> , 2011)
-	Omp22	22,19 1.71	9.02	212	AFM3727 5.1	Proteína de la membrana externa, función desconocida.	(Huang <i>et al.</i> 2016)
-	PKF	49,19 9.49	9.23	458	AEA3009 9.1	Serina proteasa, resistencia a la muerte por el sistema del complemento, suprime la formación de biopelículas y participa en la resistencia al suero	(Bolourchi N <i>et al.</i> , 2019)
-	TonB	24,40 2.25	9.26	211	SUU6873 9.1	Adquisición de nutrientes como Zinc, hierro y níquel.	(Hassan <i>et al.</i> , 2016)

-	CsuA/B	18,46 0.61	4.94	178	AXV5184 3.1	Motilidad, la adherencia de la célula huésped y competencia natural	(Ramezanalizad eh F. <i>et al.</i> , 2020)
-	FilmA	32,60 7.69	9.06	301	ADX0390 3.1	Motilidad, la adherencia de la célula huésped y la competencia natural	(Ramezanalizad eh F. <i>et al.</i> , 2020)
-	AdeK	52,80 2.26	9.02	484	AXV5342 8.1	Proteína de la membrana externa, participa en la resistente antimicrobiana.	(Hassan <i>et al.</i> , 2016)
-	FhuE	79,58 6.39	5.13	718	KMV2751 5.1	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos.	(Hassan <i>et al.</i> , 2016)
-	PonA	92,02 0.94	8.28	826	ADX0508 0.1	Proteína de unión a la penicilina, biogénesis de la pared celular.	(Hassan <i>et al.</i> , 2016)
-	Ata	206,6 22.80	7.02	2038	WP_0319 79517.1	Adherencia a células eucariotas o proteínas de la matriz extracelular y contribuye a la virulencia.	(Weidensdorfer <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 7: Análisis *in silico* de proteínas inmunogénicas. Se muestran las características fisicoquímicas de las proteínas Identificadas teóricamente y el spot correspondiente. El número de spot corresponde a los spots detectados en el análisis inmunoproteómicos figura 15 y 16. Se identificaron ocho proteínas, incluidas BamA, OprC, Bpl1, FilF, OprF, Oxa-23, OmpA y MotB. Las proteínas marcadas con

– corresponden a las proteínas identificadas teóricamente a partir de los análisis *in silico* de la figura 13. El PM: peso molecular, pl: punto isoeléctrico longitud fueron estimadas a partir del programa ExPASy. El Código de identificación fue recuperado de GENBANK. La función celular fue determinada por diferentes programas incluidos: MASCOT, UniProt, Protscale Expasy, ScanProsite.

7.8 Predicción de epítomos de las proteínas detectadas.

Se realizó un análisis de predicción de epítomos de las ocho proteínas detectadas incluidas; OmpA, Oxa-23, OprC, OprF, BamA, Bpl1, MotB y FilF.

El software ABCpred nos permitió predecir epítomos lineales de células B basado en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, como el grado de hidrofobicidad, polaridad, flexibilidad y la exposición de epítomos en la superficie celular. Este servidor selecciona epítomos con un elevado porcentaje de seguridad (65,93%) comparado con otros servidores.

Basados en este programa fueron predichos 38 epítomos de células B con puntuaciones de 0.94 - 0.60 para la proteína OmpA (Tabla 8). Para la proteína Oxa-23 se predijeron 23 epítomos con puntuaciones de 0.86 - 0.60 (Tabla 9). Para OprF se predijeron 15 epítomos con puntuaciones 0.91 - 0.60 (Tabla10). En FilF se predijeron 61 epítomos con puntuaciones 0.96 - 0.60 (Tabla 11). Para la proteína BamA se identificaron 78 epítomos con puntuaciones 0.94 - 0.60 (Tabla 12). En la proteína Bpl1 se predijeron 296 con puntuaciones 0.96 - 0.60 (Tabla 13). Para MotB se identificaron 35 epítomos con puntuaciones 0.95 - 0.60 (Tabla 14). Y para la proteína OprC se detectaron 65 epítomos con puntuaciones 0.94 - 0.60 (Tabla 15). Todas las predicciones reportadas en este análisis proporcionan datos de alta confianza y significativos ya que fueron igual o mayores a 0.6.

OmpA

Secuencia

KLSRIALAT MLVAAPLAAA NAGVTVTPLL LGYTFQDSQH
 NNGGKDGNTNSPELQDDLFGAALGIELT PWLGFEAEYN
 QVKGDVDGAS AGAEYKQKQI NGNFYVTS DLITKNYDSKIK
 PYVLLGAGHY KYDFDGVNRG TRGTSEEGTL GNAGVGFWR
 LNDALSLRTEARATYNADEE FWNYTALAGL NVVLGGHLKP
 AAPVVEVAPV EPTPVAPQPQ ELTEDLN MELRVFFDTNKS
 IKDQYKPEIA KVAEKLSEYP NATARIEGHT DNTGPRKLNE
 RLSLARANSVKSALVNEYNVDASRLSTQGFQAWDQPIADNKT
 EGRAMNRR VFATITGSRT VVVQPGQEAA APAAAQ

Number of amino acids: 356

Molecular weight: 38449.99

Theoretical pI: 5.32

Tabla 8: Epítotos B identificados en OmpA por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	Puntaje
1	RGTSEEGTLGNAGVGA	142	0,94
2	DERECHONTGPRKLNE	265	0,90
3	HLKPAAPVVEVAPVEP	197	0,90
4	PVVEVAPVEPPTPVAPQ	203	0,89
5	KGDVDGASAGAEYKQK	83	0,86
6	LSLARANSVKSALVNE	282	0,85
7	ADEEFWNYTALAGLNV	177	0,85
8	EGRAMNRRVFATITGS	323	0,84
9	QGFQAWDQPIADNKTKE	308	0,84
10	GIELTPWLGFEAEYNQ	66	0,83
11	NNGGKDGNTNSPELQD	42	0,83
12	DSKIKPYVLLGAGHYK	116	0,83
13	AGHYKYDFDGVNRGTR	127	0,82

14	RVFATITGSRTVVVQP	330	0,80
15	SALVNEYNVDASRLST	292	0,80
16	YPNATARIEGHTDNTG	259	0,80
17	GTLGNAGVGFWR LND	148	0,80
18	LG YTFQDSQH NNGGK	31	0,79
19	YKPEIAKVAEKLSEYP	245	0,79
20	SPELQDDLFGAALGI	52	0,78
21	GVTVTPLLGYTFQDS	23	0,77
22	RTEARATYNADEEFWN	168	0,76
23	SDLITKNYDSKIKPYV	108	0,76
24	TPVAPQPQELTEDLNM	213	0,75
25	VAAPLAAANAGVTVTP	13	0,75
26	FEAEYNQVKGDVDGAS	75	0,74
27	QPIADNKTKEGRAMNR	314	0,74
28	AEYKQKQINGNFYVTS	93	0,73
29	KSNIKDQYKPEIAKVA	238	0,73
30	TVVVQPGQEAAAAPAAA	340	0,72
31	GPRKLNRLSLARANS	274	0,72
32	PQELTEDLN MELRVFF	219	0,71
33	TALAGLNVVLGGHLKP	185	0,71
34	NDALSLRTEARATYNA	162	0,71
35	MKLSRIALATMLVAAP	1	0,71
36	VDASRLSTQGFQAWDQP	300	0,68
37	LRVFFDTNKSNIKDQY	230	0,62
38	VGAFWR LNDALSLRTE	155	0,60

Oxa-23

Secuencia

MNKYFTCYVVASLFLSGCTVQHNLINETPS
 QIVQGHNVQVIHQYFDEKNTSGVLVIQTDK
 INLYGNALSRANTEYVPASTFKMLNALIGL
 ENQKTDINEIFKWKGEKRSFTAWEKDMTGL
 EAMKLSAVPVYQELARRIGLDMQKEVKRI
 GFGNAEIGQQVDNFWLVGLKVTPIQEVF

VSQLAHTQLPFSEKQVANVKNMLLLEESNG
 YKIFGKTGWAMDIKPQVGWLTGWVEQPDGK

Tabla 9: Epítotos B identificados en Oxa-23 por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	
1	PASIRNELLMKSLKQL	255	0.86
2	GHNQVIHQYFDEKNTS	35	0.84
3	GWVEQPDGKIVAFALN	232	0.84
4	HQYFDEKNTSGVLIQ	41	0.83
5	AWEKDMTLGEAMKLSA	112	0.81
6	NAEIGQQVDNFWLVGP	154	0.80
7	AVPVYQELARRIGLDL	127	0.80
8	KGEKRSFTAWEKDML	104	0.79
9	DKKINLYGNALS RANT	58	0.78
10	VLVIQTDKKINLYGNA	52	0.78
11	LFLSGCTVQHNLINE	13	0.78
12	EMRSEMPASIRNELLM	249	0.77
13	DGKIVAFALNMEMRSE	238	0.77
14	TGWAMDIKPQVGWLTG	217	0.76
15	SQLAHTQLPFSEKQVA	182	0.76
16	NALS RANTEYVPASTF	66	0.74
17	GYKIFGKTGWAMDIKP	210	0.73
18	GPKVTPIQEVEFVSQ	168	0.73
19	NLINE TSPQIVQGHNQ	23	0.72
20	VKRIGFGNAEIGQQVD	147	0.71
21	IGLENQKTDINEIFKW	88	0.65
22	TEYVPASTFKMLNALI	73	0.65
23	SEKQVANVKNMLLEE	192	0.60

OprF Secuencia

MLYTAVLVIC GCTNAPSRQP LEYLGIIQQHE YSNKHVFCDT
 VDRGLYPVCN QLTVKTPADN
 FNIDDLKNE PAAIVNFDN KSILKPEAKN ILDAVIQNP
 YQKILYLKG YTDNIGGEKY
 NNILAQKRAD SVKSYLSMKG LPNEMMVSLG FGLCCYVVEN
 NTDSNREKNR RVEIYIDSKN

Number of amino acids: 180

Molecular weight: 20368.31

Theoretical pI: 7.54

Tabla 10: Epítotos B identificados en OprF por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	Puntaje
1	DAVIQNPYQKILYL	93	0.91
2	AVLVICGCTNAPSRQP	5	0.88
3	CDTVDRGLYPVCNQLT	38	0.87
4	YLKGYTDNIGGEKYN	107	0.86
5	LSMKGLPNEMMVSLGF	136	0.85
6	QLTVKTPADNFNIDL	51	0.84
7	ADSVKSYLSMKGLPNE	129	0.84
8	YLGIIQQHEYSNKHVFC	23	0.83
9	FGLCCYVVENNTDSNR	151	0.83
10	PAAIVNFDNKSILKP	71	0.81
11	TDSNREKNRRVEIYID	162	0.78
12	GGEKYNNILAQRADS	116	0.76
13	NIDDLKNEPAAIVNF	62	0.67
14	FNKSILKPEAKNILDA	79	0.65
15	GCTNAPSRQPLEYLG	11	0.60

FilF

Secuencia

```

MNKKILWPFA LTTIALMLNG CGGGSSTINE DPNSGTNNGN
LTSGSCTPTT SDNGAEDSTC LQFALDYPIA GINFDCCSAT
NFHYATKISG NAVIGSCKVG DTARFYIQSK DNKKVFLGNV
NLDITIGKFTA VNGKSKEINP IYLRVLDLAS GITGKAPTLL
DKNDETIKVA IALIKIFQSI GVENGDNLIG DIQPTQLTDI
KKDQLTKISQ SVTATEFQNG AYASILKPWL DVNQISDDDA
YKLLVQTTNL SNAGVFQSFN LFINSTILQN YQVFNCGNRS
TQEECLNNTI NLRHSTDDLY LLSDRQGYTL GYGLQWKGSA
IVIDNKVQNP YLLTTKVKPA KLVNAQNNW LNPVRSREIQS
TTPRLRSFSN NPNEDLQIYQ GKFFNDYGVA GTEAFYKYLK
KLSTGNPQHY GLWRQNVGDG NYNGVLSIIK SNPISYLERN
VFKTSGNVKT GEKYIFPLYA TLTFNFSDTT IQPVNLGIVI
DEHGDIRTDI KPNSTTTDMS GQCATVSDAS LIDNNGMQQY
RIGTTAATFN DPLNGDQSVY VMILSNPKF ANIDGVMVGV
TFVGVSPGPA KLNLFNLLAN KVDSTSINFN NNTAWFNQHA
AAQESYNMLK DVPAPTAADK ALAQRKFGTV TIKLADQSI
ACKAIKTKS
  
```

Number of amino acids: 649

Molecular weight: 70861.69

Theoretical pI: 6.27

Tabla 11: Epítotos B identificados en FilF por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	Puntaje
1	TSGSCTPTTSDNGAED	42	0,96
2	HGDIRTDIKPNSTTTD	483	0,95
3	TCLQFALDYPIAGINF	59	0,94
4	GIVIDEHGDIRTDIKP	477	0.91
5	QWKGS AIVIDNKVQNP	315	0.91
6	DGDNYNGVLSIIKSNP	418	0.90
7	KLLVQTTNLSNAGVFQ	242	0.89
8	GGSSSTINEDPNSGTNN	23	0.89
9	YRIGTTAATFNDPLNG	520	0.88

10	TGNPQHYGLWRQNVGD	404	0.87
11	GITGKAPTLLDKNDET	151	0.87
12	NGCNRSTQEECLNNTI	275	0.86
13	DIKPNSTTTDMSGQCA	489	0.85
14	IFPLYATLTFNFSDTT	455	0.85
15	IGDIQPTQLTDIKKDQ	189	0.85
16	TVTIKLADQSI PACKA	629	0.84
17	DMSGQCATVSDASLID	498	0.84
18	IGSCKVGD TARFYIQS	94	0.83
19	AATFNDPLNGDQSVYV	526	0.83
20	KSNPISYLERNVFKTS	430	0.83
21	REIQSTTTPRLRSFSNN	356	0.83
22	HSTDDL YLLSDRQGYT	294	0.82
23	ISQSVSTATEFQNGAYA	208	0.82
24	SGTNNGNLTSGSCTPT	34	0.81
25	TKVKPAKLVNAQNNW	335	0.81
26	NGAYASILKPWLDVNQ	219	0.81
27	LKDVPAPTAADKALAQ	609	0.80
28	NFHYATKISGNAVIGS	81	0.79
29	TFVGVSPGPAKLNLFN	561	0.79
30	TILQNYQVFNCGNRST	266	0.79
31	VNQISDDDAYKLLVQT	232	0.79
32	LIKIFQSIGVENGDNL	173	0.79
33	IQSKDNKKVFLGNVNL	107	0.79
34	NGAEDSTCLQFALDYP	53	0.78
35	TEAFYKYLTKLSTGNP	392	0.78
36	TQEECLNNTINLRHST	281	0.78
37	ASLIDNNGMQQYRIGT	509	0.77
38	PTAADKALAQKRFKGT	615	0.76
39	DSTSINFNNTAWFNQ	583	0.76
40	VMILSNPKFANIDGV	541	0.76
41	DYGVAGTEAFYKYLTK	386	0.76

42	LLSDRQGYTLGYGLQW	301	0.76
43	DETIKVAIALIKIFQS	164	0.76
44	LDTIGKFTAVNGKSKE	122	0.76
45	FDCSSATNFHYATKIS	74	0.74
46	HAAAQESYNMLKDVPA	599	0.74
47	YGLWRQNVGDNYNGV	410	0.74
48	DNKVQNPYLLTTKVKP	324	0.74
49	LDYPIAGINFDCSSAT	65	0.73
50	AQRKFGTVTIKLADQS	623	0.73
51	QNNWLNVPVSREIQSTT	347	0.73
52	SKEINPIYLRVLDLAS	135	0.70
53	YTLGYGLQWKSAIVI	308	0,69
54	NIDGVMVGVTFVGVSP	552	0,68
55	DLQIYQGKFFNDYGVA	375	0,67
56	IGVENGDNLIGDIQPT	180	0,66
57	TNLSNAGVFQSFNLFI	248	0,65
58	PFALTCIALMLNGCGG	8	0,64
59	TDIKKQDLTKISQSVT	198	0,63
60	DTTIQPVNLGIVIDEH	468	0,62
61	PLRLSFSNPNEDLQI	363	0,62

BamA secuencia

MRHTHFLMPLALVSAMAAVQQAYAADDFVVRDIRVNLVRLT
PANVYTMPLPINSGRVNEPMIAEAIRTYATGLFDDIKASKE
NDTLVFNVIERPIISKLEFKGNKLIPEALEQGLKMGIAEG
EVFKKSALQTIETELEQQYTQQGRYDADVTVDTVARPNRVE
LKINFNEGTPAKVFDINVTGDKSEIKQAFVAVKESGWAS
VVTRNDRYAREKMAASLEALRAMYLNKGYINFNINNSQLNIS
EDKKHIFIEVAVDEGSQFKFGQTKFLGDALYKPEELQALKIY
KDGDTYSQEKVNAVQLLLRKYGAGYFADVNIQINNET
GVVDLNYVNPQGQVTVRRINFTGNSKTSDEVLRRRMEG
ALASNEKIDLSKVRLERTGFFKTVDIKPARIPNSPDQVDLNV
NVEEQHSGTTTTLAVGYSQSGGITFQAGLSQTNFMGTGNRAI

DLRSRSETQDYNNLSVTDPFYFTIDGVSRYGYNVYRKTCLNDDY
NVNNYVTDSEFGGSLFSGYPIDENQSLASVGDVNTKVTTGPY
VSTYVRDYLLANGGKATSKGTTCPTDANGNSQYDTEKGECKV
PEETYDNAFEGEFFTYNNLNGWSYNTLNRPIFPTSGMSHRVG
LEIGLPGSDVDYQKVYDTQAFFPIGSTGFVLRGYGKLGYN
DLFFYKNFYAGGYGSRGYDNSTLGPKYPSVNLQETKQNDSS
PEEVGGNALVQFGETELVLPMPFKGDWTRQVRPVLFAEGGQVF
DTKCNIDNSVYGNKGMKINGQITIDVRKYCEDNYGFDLGNLR
YSVGVGTWITMIGPLSLSYAFLNDKPGDETKEIQFEIGRT

Tabla 12: Epítotos B identificados en BamA por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	
1	EVAVDEGSQFKFGQTK	261	0,94
2	GYSQSGGITFQAGLSQ	435	0.93
3	KCNIDNSVYGNKMKI	759	0,92
4	TKLNDDYNNYVTDSE	498	0.91
5	NGNSQYDTEKGECKVP	574	0.90
6	TSKGTTCPTDANGNSQ	563	0.90
7	GVSRYGYNVYRKTCLN	486	0.90
8	QGRYDADVTVDTVAR	148	0.90
9	VLFAEGGQVFDTKCNI	747	0.89
10	LSRSETQDYNNLSVTD	464	0.88
11	AYAADDFVVRDIRVNG	22	0.88
12	ERPIISKLEFKGNKLI	94	0.87
13	FDDIKASKENDTLVFN	76	0.87
14	GGYGSRGYDNSTLGP	683	0.86
15	LRKYGNAGYFADVNI	313	0.86
16	FKFGQTKFLGDALYK	270	0.86
17	DNSTLGPKYPSVNLQE	692	0.85
18	TGPYVSTYVRDYLLAN	543	0.85
19	YKDGDTYSQEKVNAV	294	0.85

20	KESGWASVVRNDRYA	204	0.85
21	IRTLYATGLFDDIKAS	67	0.84
22	ARIPNSPDQVDLNVNV	407	0.84
23	VVTRNDRYAREKMAAS	211	0.84
24	TWITMIGPLLSLSYAFP	806	0.83
25	NVYTMLPINSGDRVNE	45	0.83
26	NGLVRLTPANVYTMLP	36	0.83
27	TGVVDLNYVNPQQV	336	0.83
28	AGYYFADVNIVPQINN	319	0.83
29	YGKLYGNDLPPFYKNF	665	0.82
30	TDSFGGSLSGFYPIDE	511	0.82
31	GITFQAGLSQTNFMGT	441	0.82
32	FVVRDIRVNGLVRLTP	28	0.82
33	PFKGDWTRQVRPVLFA	735	0.81
34	TVDIKPARI PNSPDQV	401	0.81
35	MGIAEGEVFKKSALQT	121	0.81
36	LSLSYAFPLNDKPGDE	814	0.80
37	GLEIGLPGSDVDYQKV	630	0.80
38	TYVRDYLLANGGKATS	549	0.80
39	VGVDNTKVTGPIYVST	534	0.80
40	SQTNFMGTGNRVAIDL	449	0.80
41	RAMYLNKGYNFNINN	231	0.80
42	REYQTITDVRKYCED	773	0.79
43	GDRVNEPMIAAEAIRTL	55	0.79
44	KFLGDALYKPEELQAL	276	0.79
45	DVTVDTVARPNRVEL	154	0.79
46	RKYCEDNYGFDLGNLR	783	0.78
47	GFVLRGYGKLGYGNDL	659	0.78
48	LNLGWSYNTLNRPIFP	606	0.78
49	GYPIDENQSLASVGV	521	0.78
50	LQTIETELEQQYTQQG	134	0.78
51	TEKGECKVPEETYDNA	581	0.77

52	TGRNRVAIDLSRSETQD	456	0.77
53	QVTVRRINFTGNSKTS	350	0.77
54	QETKQNDSSPEEVGGN	706	0.76
55	QKVTYDQTQAFFPIGST	643	0.75
56	TSDEVLRRERQMEGA	364	0.75
57	NRPIFPTSGMSHRVGL	616	0.74
58	SKVRLERTGFFKTVDI	389	0.74
59	YPSVNLQETKQNDSSP	700	0.73
60	PEELQALKIYKDGDTY	285	0.73
61	PAKVFDINVIGNTVFK	178	0.73
62	FGTELVLPMFPKGDWT	726	0.72
63	VPEETYDNAFEGEFTT	588	0.72
64	INVIGNTVFKDSEIKQ	184	0.71
65	NQLSASVGDNTKVT	527	0.70
66	QHSGTTTTLAVGYSQSG	425	0.70
67	NEKIDLSKVRLERTGF	383	0.70
68	RQMEGALASNENIÑOS	374	0.70
69	PQINNETGVVDLNYV	330	0.70
70	FDLGNLRYSVGVTW	792	0,69
71	FLMPLALVSAMAAVQQ	6	0,69
72	AFEGEFTTYNLNLGWS	596	0,68
73	EVGGNALVQFGTELVL	717	0,65
74	FPLNDKPGDETKEIQF	820	0,64
75	NVNNYVTD SFGGSLSF	505	0,64
76	TVFKDSEIKQAFVKE	190	0,63
77	FFPIGSTGFVLRGYGK	652	0,61
78	VELKINFNEGTPAKVF	167	0,60

Bp1

o

BapA

Secuencia

NVQGTKNIVIDPKVIAKIDINPERIASITRDGNSAVIHLKDGTEIVLE
 NFFISENPQILLNEGQTYWTANLAEDATGQTTVNYLELKEIPKYIDAS

SSVPIWSWVVSALAGAGTAALLSQDQAKDKTPPEPGKLSFQNLDSGE
 LTQDQITNDKNFNKLSGQEKSSVYLIISTDEGKTWQETTLLNQKDLA
 DGIYLYKAVVTDAAAGNTSETAVQKVVVDTTAPQAGELTSLDSDTGIS
 ATDQITQDKNFNKLLEGQESGSRVYLVSTDEGKTWQETTIAQKDLTD
 GYQYKAVVTDAAAGNTSEMAVQKVVVDTTTPQAGELTSLDNDTGVSV
 TDQITQDKNFNKLLEGQETGSQVYLVSTDEGKTWQETTVAQKDLADG
 IYQYKALVIDIAGNISETAIQKVVVDTTAPQAGKLTSLDNDTGVSAT
 DQITQDNSFTLKLQPIVIGEQAALLDHYEVSKDEGKTWQETTADQKD
 LADGIYQYKAVVTDLAGNISESAIQKVVVDNSLVNVESTTVIVKPI TED
 NTSISLVEKDQVISIRLETANLPTDLNSSLTNTVNTLDNVTYNFHFDEV
 TQEWVTEIPAEFLWSVEPQTNISIDISLTDQAGNTAIITHTQNYNVDH
 TPNSPTLDSLTFNNIDGAIISGSAYKGSKVDIYNKNGDWLASTITNEE
 GKFTLQDLSINSNQEVYAVATYNGYSSSENSI GLVTEVPAISITRISP
 EGVISGYATEGSYFIVKQNGNILQEFNSNVFDSG GITPFSVMALGEV
 RPFILSLDQPLEEGAQIIISTDKNISGHPQYITADYTPAVFLETPQF
 DISGETLSVHVNEPNSFIRAFSGEENLIATGFTDEQGFASLQVQFLK
 EGETVTVQVVDKNQNTSETLIEVNPFAIIPHVERITQEGELISGVAEDN
 STVIVRDADGNELGKVTLLGDDNSWSDFSHFLNVNRPLIDREKISVQI
 IDNKGLMSPEQNIIVDLTPPPAPTELFNFNDAGDLVYGHAEFPSEILVK
 DGQGNILNKWFNNWTDSESGSFIELGTFLTNAETVYVVTATDVNGNVS
 LAAQIQAPNYAFAPHVDSFTSDGVISGQAENNSTLTVKDAKGDVVAEI
 KVGEDNGWNGSSYFKLQDLRPLVDGEQFFLSIKDARGQVSA DTVITAD
 TVAPTASNLVSEDSGYLTGVAELNNTIQVFDHNGQLVNIWNNTINS
 DGTFTIYLSGNNLHGEVFTVTVKQAGNVSEAISINAPLDDIAPNPIK
 NILLDANGQNFTAQAEANSQIEVFDSLGNQGTGWGSTDSAGNASGSFNQ
 TYLHGEELTFVVIDRAGNRSIEFKQNALIDTIAPNPIENIIFNENGQS
 FTAQAEAGSSIDVLDQGTGNKIGFGYTDSSGNVSGYFQQVYVYHGEELTF
 VVIDRAGNRSAEVKQALNDDVAPNPIENIIVLDLNGQNFTAQAEANSQ
 IEIKNNNGDVVGYGSADSAGNVSGYLYQVHLHGEELTFIVVDRAGNRS
 TEVKQNALIDDIAPNPIENIILDINGQNFTAQAEANTQIEVKNVAGEI
 VSGSYVDGAGNVSGYLYQVYHGEELTFVVDVDRAGNRSTEVKQNALID
 NIAPNPIENIILLDANGQNFTAQAEANTQIEVKNVAGEIVGSGSTDSMG
 NVSGYFYQVYVYHGEELTFVVDVDRAGNRSTEVKQNALIDDIAPNAIENI
 IFNENGQNFTAQAEANSKVEVKNAAGEVVGSGYVDSAGNVSGYLNQVY
 LKGEELTFVVIDQAGNRSIEVKQTAFLDNTAPENATNLVSEDSGYSLS
 GMAEPNATI QIFDQYGLLNQWNNVNDGTFNIYLSNMYHGEVFKV
 VVVDQAGNLSGEVTVKAPLDDIAPVAASDLVFNEDGSFLSGVAEPNTF
 IQIFDQNGQMMNTWSQSVNADGFTTIFFGTYNLHGEFTVIVKDLAGN
 VSEAVSVKAPLDDIAPNPIKNIIVFDANGQSFTAQAEANSQIEIFDSFG
 SQIGWGSTDSTGNVTGYFYQVYVYHGEELTFVVIDRVGNRSDMKLNAL
 MDTIAPKPIENIIFNENGQNFTAQAEANSFISVKNAAGEFVGYGYVDS
 TGNVSGHFNQVYVYHGEELTFIVIDKAGNQSIEYKQNALTDIAPNPIE
 NIVLNKNGQNFTAQAEADSQIEVKNVAGEVVGSGYVDSIGNVSGSFNQ
 VYVYHGEELTFVVDVDRAGNRSTEVKQNALIDDIAPNQIENIIVDVNGQY
 FTGRAEADTRIEVLQDFGNRAGWYVDSQGNVIGYFNQVYVYHGEELTF
 IVVDIAGNRSIEVKQNALIDNVAPAAATNITLSSDGLLFGEAEPNATI
 EIIDQYGA VITTTTYVWYDGT FNQWINLSQYQTNLSIVVKDQAGNRSE
 VVHELVPVFTNSPIAATELKLDDIDGHILT GKATVGMVVVSTSDGQTI
 NGGWNAVNE DGSFAIQLNDDYLLQGQTLQVRVYDQNTNQYSLISEIIA
 PLDNIAPIVINEVVINNDGYGITGQTD SKAIQVMDADGDLRAEFQADE
 TGYFNASIYPPILRGEQLFITAI DLAKNISKPFNITFNADTNAPPSAE
 HIVVSENGFFIEGTAVAI STVHIFDVHSHNVATNVADEAGNFNIQLYP

PLASGQILRIVVEYNGYQSAYTEITAPIDTVPNAATQLVLEDGNVLS
 GQAEAYSIVNIFDANNNLVGTQNVGSDGAF LTHLWYEWGHTLTVKV
 VDAQNVSVGTTIVAINDTVVFDVVQTLAIDEWGS LTRVESYATVEL
 TYHFTDQPLSVTSTTALANGMFFIYLDRNATSLDLTVIDRAGNRSETI
 SQIISDLPTVIIDHFKGDATDNTYNIDTIDDFVQYEVIVEPYAIYKDVW
 IDNSYMSYSDWVIEGHYEQIWFVVDGYYESQWATSGYSTVQNIYQNGI
 TYIDNGTADNDYSRYEQYYDFVNGQWQEGYELTYIRSEEGVDTSHY
 EDVYIDTSHYEEVWVDTSHYQDIWVENSYWESQLVESGRRVDLGGHD
 KIISVNYSLVGLYQTVNDPTTVDSFLESGRYVEDLELVGSAHLNATG
 NALDNLLTGNNGNVLNREGRNDTYITNEGDTTIVFQLLNSQDARTGN
 GHDTVLDFTLGDITNLQADKIDSELLIDYSKDV SALAKFITVEQDA
 GNTTISLDRDGE GTFNVRVSLTLNQNVTTLDELNNQIIV

Tabla 13: Epítotos B identificados en Bp1 por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	
1	GVSVDQITQDKNFNL	334	0.96
2	PTVIIDHFKGDATDNT	2793	0.96
3	ISEIIAPLDNIAPVIN	2444	0.94
4	GELTQDQITNDKNFNL	144	0.94
5	EVTVKAPLDDIAPVAA	1837	0.93
6	DGVISGQAENNSTLTV	1079	0.93
7	GVYQYKAVVTDAAAGNT	290	0.92
8	YESQWATSGYSTVQNI	2859	0.92
9	GISATDQITQDKNFNL	239	0.92
10	ALAKFITVEQDAGNTT	3110	0.91
11	GWVDTSHYEDVYIDTS	2922	0.91
12	GKTWQETTIAQKDLTD	274	0.91
13	RSEVVHELVPVFTNSP	2351	0.91
14	AISINAPLDDIAPNPI	1233	0.91
15	FSEDSGYLTGVAELNT	1165	0.91
16	NISIDISLTDQAGNTA	598	0.90
17	YQTVNDPTTVDSFLES	2991	0.90
18	GITYIDNGTADNDYSR	2880	0.90
19	EFQADETGYFNASIYP	2492	0.90
20	AVITTTTYVWYDGT FNQ	2313	0.90

21	NATIEIIDQYGAVITT	2302	0.90
22	AVSVKAPLDDIAPNPI	1925	0.90
23	NATIQIFDQYQQLLNQ	1783	0.90
24	DVYIDTSHYEEVWVDT	2931	0.89
25	QEYIVEPYAIYKDVWI	2819	0.89
26	FVVIDRAGNRSAEVKQ	1393	0.89
27	TGWGSDTSAGNASGSF	1280	0.89
28	DAKDKTPPEPGKLSFQ	123	0.89
29	DVVAEIKVGEDNGWNG	1100	0.89
30	VQIIDNKGLMSPEQNI	959	0.88
31	AEDNSTVIVRDADGNE	910	0.88
32	DNISGHPQYITADYTP	793	0.88
33	TGGNGHDTVLDFTLGD	3070	0.88
34	SRYEQQYYDFVNGQWQ	2894	0.88
35	VVTSTDGQTINGGWNN	2392	0.88
36	GKTWQETTLNQKDLAD	179	0.88
37	RITQEGLISGVAEDNS	899	0.87
38	GKTWQETTVAQKDLAD	369	0.87
39	TVEQDAGNTTISLDRD	3116	0.87
40	HYEQIWFVDGYYESQW	2848	0.87
41	QLFITAIIDLAKNISKP	2514	0.87
42	GYGITQGTDSKAI IQV	2467	0.87
43	EVVINNDGYGITGQTD	2460	0.87
44	SFAIQLNDDYLLQGQTL	2414	0.87
45	NNNVNWDGTFNIYLNS	1800	0.87
46	GNKIGFGYTDSSGNVS	1363	0.87
47	NNTINSDDGFTIYLSG	1196	0.87
48	AELNTTIQVFDHNGQL	1176	0.87
49	FSEILVKDGGQGNILNK	1003	0.87
50	EGETVTVQVVDKNQNT	866	0.86
51	TAIITHQTQNYNVDHPT	612	0.86
52	TTVIVKPITEDNTISL	519	0.86
53	SESAIQKVVVDNSLNV	501	0.86
54	GKTWQETTADQKDLAD	469	0.86
55	TTTTQAGELTSLDLND	317	0.86
56	GREGNDTYITNEGTD	3043	0.86

57	KDVWIDNSYMYSDWVI	2830	0.86
58	IVAINDTVVPDVVTQL	2702	0.86
59	ITAPIDTVPNAATQL	2617	0.86
60	TNVADEAGNFNIQLYP	2578	0.86
61	GSQIGWGSTDSTGNVT	1969	0.86
62	DQYGGQLLNQWNNVNW	1790	0.86
63	VGEIVGSGYVDGAGNV	1534	0.86
64	SGSFNQTYLHGEELTF	1292	0.86
65	QIIISTDKDNISGHPQ	785	0.85
66	PFSVMALGEVRPFILS	760	0.85
67	SVEPQTNISIDISLTD	592	0.85
68	QKVVVDTTTTQAGELT	311	0.85
69	TSHYQDIWVENSYWES	2946	0.85
70	RVESYATVELTYHFTD	2728	0.85
71	AEAYSIVNIFDANNL	2644	0.85
72	NGYQSAYTEITAPIDT	2608	0.85
73	YLQGGTQLQVRVYDQNT	2423	0.85
74	GEVVGSGYVDSAGNVS	1707	0.85
75	KDLADGIYQYKAVTD	480	0.84
76	ELLIDYSKDV SALAKF	3099	0.84
77	GNALDNLLTGNSGNNV	3025	0.84
78	PTTVDSFLESGRYVED	2997	0.84
79	HGETLTVKVVVDANQNV	2681	0.84
80	ILTGKATVGMVVVTS	2380	0.84
81	AGEVVGSGYVDSIGNV	2140	0.84
82	DSQIEVKNTAGEVVG	2131	0.84
83	APNPIKNIVFDANGQS	1936	0.84
84	QNALIDDIAPNAIENI	1666	0.84
85	SGYLYQVYLHGEELTF	1550	0.84
86	AAQIQAPNYAFAPHVD	1059	0.84
87	DNSWSDFSHFSLNVNR	934	0.83
88	EVPNFAYIPHVERITQ	887	0.83
89	GSKVDIYNKNGDWLAS	652	0.83
90	EWVTEIPAFLWSVEP	580	0.83
91	LGDIRTNLQADKIDLS	3083	0.83
92	TNEGTDITIVFQLNSQ	3052	0.83

93	NSYWESQLVESGRRDV	2956	0.83
94	LTHLWYEWYHGETLTV	2672	0.83
95	DTRIEVLQDFGNRAGW	2217	0.83
96	TGYFYQVYLHGEELTF	1984	0.83
97	KDLADGIYLYKAVVTD	190	0.83
98	AGEVIGSGSTDSMGNV	1620	0.83
99	DVLDTQTKNGKIGFYTD	1357	0.83
100	AGNVSEAISINAPLDD	1227	0.83
101	DGFTFIYLGSNLHGE	1202	0.83
102	TVYVTATDVNGNVSILA	1044	0.83
103	QFDISGETLSVHVNEP	816	0.82
104	SGYATEGSYFIVKDQN	726	0.82
105	QTYWTANLAEDATGQT	65	0.82
106	DQVISIRLEIANLPTD	538	0.82
107	TTAPQAGKLTLSDLND	412	0.82
108	DRDGEGETMFRVSLLT	3129	0.82
109	VGSAHLNATGNALDNL	3016	0.82
110	YELTYIRSEEGWVDTST	2912	0.82
111	DWVIEGHYEQIWFVDG	2842	0.82
112	SQSVNADGTFIIFGGT	1888	0.82
113	QQMNTWSQSVNADGTF	1882	0.82
114	IAKIDINPERIASITR	16	0.82
115	AGAGTAALLSQDQAKD	111	0.82
116	DESGSFSIELGTFLTN	1026	0.82
117	DLVYGHAEPPFSEILVK	994	0.81
118	NIVIDPKVIAKIDINP	8	0.81
119	GVSATDQITQDNSFTL	429	0.81
120	TGSQVTYLVSTDEGKT	356	0.81
121	HFKGDATDNTYNIIDTI	2799	0.81
122	AIDEWGSLTGRVESYA	2718	0.81
123	LRIVVEYNGYQSAYTE	2601	0.81
124	GQESGSRVTVLVSTDE	258	0.81
125	AVAISTVHIFDVHNSH	2560	0.81
126	QNALIDDIAPNQIENI	2186	0.81
127	VVVDNRNRSTEVKQN	2172	0.81
128	YGYVDSTGNVSGHFNQ	2060	0.81

129	LSGVAEPNTFIQIFDQ	1864	0.81
130	TYLISTDEGKTWQETT	171	0.81
131	VVVDNRNRSTEVKQN	1652	0.81
132	GQEKGSSTVYLISTDE	163	0.81
133	VVVDNRNRSTEVKQN	1566	0.81
134	IVVDNRNRSTEVKQN	1480	0.81
135	AEVKQSALNDDVAPNP	1404	0.81
136	HGEVFTVTVKDQAGNV	1215	0.81
137	LKEIPKYIDASSVPI	87	0.80
138	NQEVYAVATYNGYSSE	686	0.80
139	SGSAYKGSKVDIYNKN	646	0.80
140	NSPTLDSLTFNNIDGA	628	0.80
141	ANLPTDLNSSLTSVNT	548	0.80
142	QKVVVDTTAPQAGKLT	406	0.80
143	RYVEDELELVGSAHLNA	3008	0.80
144	LSQYQTQNLISIVVKDQ	2332	0.80
145	GNRAGWGYVDSQGNVI	2227	0.80
146	PNPIENIVLNKNGQNF	2109	0.80
147	KGEELTFIVIDKAGNQ	2079	0.80
148	PKPIENIIFNENGQNF	2023	0.80
149	IYLYKAVVTDAAAGNTS	196	0.80
150	TFTIFFGTYNLHGEEF	1896	0.80
151	VVIDQAGNRSIEVKQT	1738	0.80
152	PNAIENIIFNENGQNF	1675	0.80
153	PNPIENILLDANGQNF	1589	0.80
154	DRAGNRSIEFKQNALI	1311	0.80
155	QVSADTVITADTVAPT	1143	0.80
156	PQYITADYTPAVFLET	799	0.79
157	YSTVQNIYQNQNGITY	2868	0.79
158	DRVGNRSDEMKNALM	2003	0.79
159	HGEELTFVVIDRVGNR	1993	0.79
160	AGNVSEAVSVKAPLDD	1919	0.79
161	EVKQTAFLDNTAPENA	1749	0.79
162	QNALIDDIAPNQIENI	1322	0.79
163	PNPIKNILLDANGQNF	1245	0.79
164	PPAPTELNFNDAGDLV	981	0.78

165	IATGFTDEQGFASLQV	845	0.78
166	NSFIRAFSGEGNLIAT	832	0.78
167	NGTADNDYSRYEQQYY	2886	0.78
168	DLTVIDRAGRNETIS	2771	0.78
169	RVTYLVSTDEGKTWQE	264	0.78
170	NPERIASITRDGNSAV	22	0.78
171	FSEDGSYLSGMAEPNA	1769	0.78
172	QNALIDDIAPNPIENI	1494	0.78
173	EQNIIVDLTPPPAPTE	971	0.77
174	LTLNQVNTTLDPELLN	3143	0.77
175	TVLDFTLGDIRTNLQA	3077	0.77
176	DKIISSVNYSLVGLYQ	2977	0.77
177	HGEELTFIVVDIAGNR	2251	0.77
178	APNQIENIVFDVNGQY	2194	0.77
179	VVDTTAPQAGELTSLD	219	0.77
180	QNALTDIAPNPIENI	2100	0.77
181	VVVDQAGNLSGEVTVK	1826	0.77
182	HGEVFKVVVDQAGNL	1819	0.77
183	DGTFNIYLSNYMHGE	1806	0.77
184	HGEELTFIVVDRAGNR	1473	0.77
185	SGRRDVLGGHDKIIS	2966	0.76
186	TYNIDTIDDFVQYIV	2808	0.76
187	TVELTYHFTDQPLSVT	2734	0.76
188	QVRVYDQNTNQYSLIS	2430	0.76
189	HGEELTFVVVDRAGNR	2165	0.76
190	ISVKNAAGEFVGYGYV	2048	0.76
191	TFIQIFDQNGQOMNTW	1872	0.76
192	HGEELTFVVVDRAGNR	1645	0.76
193	HGEELTFVVVDRAGNR	1559	0.76
194	PNPIENIILDINGQNF	1503	0.76
195	YGSADSAGNVSGYLYQ	1454	0.76
196	QIEIKNNNGDVVGYGS	1441	0.76
197	FKLQLDRPLVDGEQFF	1119	0.76
198	TTVAQKDLADGIYQYK	375	0.75
199	TRDGNSAVIHLKDGTE	30	0.75
200	LANGMFFIYLDRNATS	2754	0.75

201	IVVDIAGNRSVEVKQN	2258	0.75
202	TGRAEADTRIEVLQDF	2211	0.75
203	GNTSETAVQKVVDVDTT	208	0.75
204	SGYFYQVYLHGEELTF	1636	0.75
205	SGYFQQVYLHGEELTF	1378	0.75
206	VPIWSVVVSALAGAGT	100	0.75
207	DQNGNILQEFNSNVFD	739	0.74
208	ALLDHYEVSKEGKTW	457	0.74
209	GIYQYKALVIDIAGNI	385	0.74
210	EEVWVDTSHYQDIWVE	2940	0.74
211	NISKPFNITFNADTNA	2525	0.74
212	GGWNNVAVNEDGSFAIQ	2403	0.74
213	DGLLFGEAEPNATIEI	2292	0.74
214	FDVNGQYFTGRAEADT	2203	0.74
215	SGSFNQVYLHGEELTF	2156	0.74
216	IVIDKAGNQSIEYKQN	2086	0.74
217	HGEEFTVIVKDLAGNV	1907	0.74
218	RPLVDGEQFFLSIKDA	1125	0.74
219	QGNILNKWFNNWTDE	1012	0.74
220	SVHVNEPNSFIRAFSG	825	0.73
221	SLTDQAGNTAIIHTHTQ	604	0.73
222	GNISETAIQKVVDVDTT	398	0.73
223	TGNSGNNVNLNGREGND	3033	0.73
224	HIVVSENGFFIEGTAV	2546	0.73
225	AIIQVMDADGDLRAEF	2478	0.73
226	HGEELTFVVVIDRAGNR	1387	0.73
227	TAQAEAGSSIDVLDQT	1347	0.73
228	HGEELTFVVVIDRAGNR	1301	0.73
229	YKAIIVTDLAGNISESA	489	0.72
230	DGTEIVLENFFISENP	42	0.72
231	SQIISDLPTVIIDHFK	2786	0.72
232	VGSDGAFLTHLWYEW	2665	0.72
233	HSNHVATNVADEAGNF	2572	0.72
234	NSQIEIFDFSQIGW	1959	0.72
235	PNPIENIVLDLNGQNF	1417	0.72
236	PITEDNTISLVEKDQV	525	0.71

237	NASIYPPILRGEQLFI	2502	0.71
238	AGELTSLSDLSDTGISA	227	0.71
239	GSTDMSGNVSGYFYQV	1627	0.71
240	EVKQNALIDNIAPNPI	1577	0.71
241	SGYLYQVHLHGEELTF	1464	0.71
242	ITADTVAPTPASNLVF	1150	0.71
243	LTVKDAKGDVVAEIKV	1092	0.71
244	GFFIEGTAVAISTVHI	2553	0.70
245	EVKQNALIDNVAPAAA	2269	0.70
246	FTAQAEANSFISVKNA	2038	0.70
247	APVAASDLVFNEDGSF	1848	0.70
248	GYTDSSGNVSGYFQQV	1369	0.70
249	PIENIIFNENGQSFTA	1333	0.70
250	GEDNGWNGSSYFKLQL	1108	0.70
251	KGLMSPEQNIIVDLTP	965	0.69
252	AEDATGQTTVNYLELK	73	0.69
253	SITRISPEGVISGYAT	715	0.69
254	TLDNVTYNFHFDEVTD	564	0.69
255	GNTSEMAVQKVVVDTT	303	0.69
256	PLDNIAPVINEVVINN	2450	0.69
257	IGYFNQVYLHGEELTF	2242	0.69
258	SGYVDGAGNVSGYLYQ	1540	0.69
259	FTAQAEANSQIEIKNN	1432	0.69
260	AEANSQIEVFDLSGNQ	1264	0.69
261	AVVTDAAAGNTSEMAVQ	296	0.68
262	DADGDLRAEFQADETG	2484	0.68
263	VVTDAAAGNTSETAVQK	202	0.68
264	VYLKGEELTFVVIDQA	1728	0.68
265	FTAQAEANTQIEVKNT	1604	0.68
266	LASTITNEEGKFTLQD	665	0.67
267	SDLNDTGVSVTDQITQ	328	0.67
268	VSVGTTIVAINDTVVP	2696	0.67
269	NTQIEVKNVGEIVGS	1525	0.67
270	TVGMSVVVSTDGTQTI	2386	0.66
271	RPLIDREKISVQIIDN	949	0.65
272	AVFLETPQFDISGETL	809	0.65

273	GSYFIVKDQNGNILQE	732	0.65
274	VATYNGYSSSENSSIGL	692	0.65
275	TVTPNAATQLVLEDGN	2623	0.65
276	FTAQAEANTQIEVKNA	1518	0.65
277	GTFLTNAETVYVTATD	1036	0.65
278	NFNIQLYPLASGQIL	2586	0.64
279	YVDSQGNVIGYFNQVY	2234	0.64
280	LQEFNSNVFDSSGITP	745	0.63
281	EGKFTLQDLSINSQE	673	0.63
282	NLSIVVKDQAGRSEV	2339	0.63
283	SGYLNQVYLKGEELTF	1722	0.63
284	QLVNIWNNTINS DGTF	1190	0.63
285	IQVFDHNGQLVNIWNN	1182	0.63
286	LSIKDARGQVSADTVI	1135	0.63
287	AENNSTLTVKDAKGDV	1086	0.63
288	YIDASSSVPIWSWVVS	93	0.61
289	TNSPIAATELKLDDIG	2363	0.61
290	SGYVDSIGNVSGSFNQ	2146	0.61
291	LVFNEDGSFLSGVAEP	1855	0.61
292	QAEANSKVEVKNAAGE	1693	0.61
293	DEQGFASLQVVFQFLKE	851	0.60
294	YSSSENSSIGLVTEVPA	698	0.60
295	DLSINSNQEVYAVATY	680	0.60
296	SFTAQAEANSQIEIFD	1951	0.60

MotB

Secuencia

MDNNQPIIVKRVKRYAAGHHGGSWKIAFADFATAMMAFFLVLLWLLSSA
TPEQKKAISGYFQDPGFSEASAPYVIDLGGTPTPAPDKTLNPQVQQAQ
PDSNESRISPEQDQVNVADQAEENLAEQVERERLALLLQELQNKVDENP
MLKDFKQIHFEITRDGLRIQIVDAANRPMFDLGSARLQPYFEDILLA
MAETIRQVFNKISISGHTDAKPYAGNGDFGNWELSANRANAARRALVA
GGYPEGQIAQVVGYSARLFDKDKPLNPNRRIDIVVLTTRKAQKAIIEG
ETGAPEASAPAAAPGEQPKPAAEAAPAAGQPSLPADEVQKKNLFDG
GSLK LEQIKGD

Tabla 14: Epítotos B identificados en MotB por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	
1	DLGGTPTPAPDKTLNP	76	0.95
2	EQPKPAEAAPAAGAQP	304	0.93
3	SGYFQDPIGFSESASP	57	0.91
4	KISISGHTDAKPYAGN	203	0.88
5	NPQVQAQPDSDNESRIS	90	0.86
6	FSESASPYVIDLGGTP	66	0.86
7	IQIVDAANRPMFDLGS	164	0.86
8	HFEITRDGLRIQIVDA	154	0.86
9	SNESRISPEQDHQVNA	99	0.84
10	TDAPYAGNGDFGNWE	210	0.84
11	LQELQNKVDENPMLKD	133	0.83
12	SAPAAAPGEQPKPAAE	296	0.82
13	AMAETIRQVPNKISIS	192	0.82
14	HHGGSWKIAFADFATA	19	0.81
15	SPEQDHQVNADQAENL	105	0.80
16	TPAPDKTLNPQVQAQP	82	0.78
17	DEVQKKNLFDGGSL	324	0.78
18	EGETGAPEASAPAAAP	287	0.78
19	TRKAQKAIEGETGAPE	279	0.78
20	LFDDKDLNPNVRRID	259	0.78
21	ATPEQKKAISGYFQDP	48	0.76
22	GQIAQVVGYSARLFD	246	0.74
23	RALVAGGYPEGQIAQV	236	0.74
24	AQPSLPADEVQKKNL	317	0.73
25	LGSARLQPYFEDILLA	177	0.73
26	RVKRYAAGHHGGSWKI	11	0.73

27	NGDFGNWELSANRANA	218	0.71
28	VGYSARLFDKDLN	252	0.70
29	NRANAARRALVAGGYP	229	0.69
30	NQPIIVKRVKRYAAGH	4	0.67
31	LWLLSSATPEQKKAIS	42	0.66
32	PMLKDFKDIHFEITR	144	0.65
33	IAFADFATAMMAFFLV	26	0.63
34	NRRIDIVLTRKAQKA	270	0.61
35	QAENLAEQVERERLAL	116	0.61

OprC

secuencia

```

MPHSKFLQP LWVAMLAVSH SGLVFAESEK NDAETNTLHS
LAPIVVTAQQ GNDANGLIVH ADPKQIQPV PATDGADYLQ
SIMGFNSIQS GGTNGDVTFR GMFGSRIKIL TDGTENLGAC
PNRMDAPTSY ISPESYDRIS VIKGPQTVQY ANTGSAATVL
FERQPEKLTSEKPYRGQASV LLGSYGRIDH NIEAAVGDDEK
KYIRLNANRS ESNSYQDGDG NTVPSAWKKW NADVALGFTP
DENTWVEITG GKSDGESLYA GRSMDSQFA RESLGLRFEK
KNITDVIKKI EGQVNSYND HIMDNFSLRT PPLVEMNHGG
MTMLMPNAMA MQVTRRTLNS RLAMTSEWNK WSLITGVDSQ
FNKHGGSMSSTMPMSMNPY RQDMRFQSYG AFGELGYQWN
DQNKLVGTGAR LDRVTVEDER ADSQAKGFNT KLEKTLPSAF
VRWENQHPEH DLKSYIGLGY VERMPDYWEL FSPKHGNAGS
TNTFNGVNPE KTLQLDLGFQ QGHGALNTWA SAYAGLVDDY
ILMSYHHHPS MGDMDGHMSH DITAGAKNVD ATIAGAEAGI
GYQFTDRIQA DLSAMYAWGK NTTDDKPLPQ ISPLEGRINI
RYVADKYNLG LLWRAVAEQN RVSLHQGNIV GYDLKPSKGF
STLSLNGSYN LRKIDIDVSVG IDNVLDKTYT EHLNKAGSAG
FGFAEEQFN NIGRNYWVRM SMKF

```

Tabla 15: Epítotos B identificados en OprC por ABCpred.

Rango	Secuencia	Posición de salida	
1	YWELFSPKHGNAGSTN	467	0.94
2	AGLVDDYILMSYHHHP	514	0.93
3	RIKILTDGTENLGACP	106	0.93
4	YGRIDHNEAAVGVDEK	185	0.91
5	HGNAGSTNTFNGVNPE	475	0.90
6	DVSVGIDNVLDKTYTE	656	0.88
7	PSMGMDGHDMSHDITA	529	0.88
8	RSESNYSQDGDGNTVP	209	0.88
9	PTSYISPESYDRISVI	127	0.88
10	FQSYGAFGELGYQWND	386	0.87
11	GESLYAGRSMDSQFA	255	0.87
12	AAVGDEKKYIRLNANR	194	0.87
13	PQTVQYANTGSAATVL	145	0.87
14	SRLAMTSEWNKWSLIT	340	0.86
15	ENLGACPNRMDAPTSY	115	0.86
16	LQSIMGFNSIQSGGTN	79	0.85
17	MYAWGKNTTDDKPLPQ	575	0.85
18	TVEDERADSQAKGFNT	415	0.85
19	GELGYQWNDQNKLVGTG	393	0.85
20	GALNTWASAYAGLVDD	504	0.84
21	KSYIGLGYVERMPDYW	453	0.84
22	HGGSMSPTMPSMNVP	364	0.83
23	RISVIKGPQTVQYANT	138	0.83
24	NGLIVHADPKQPIQPV	55	0.82
25	GMTMLMPNAMAMQVTR	320	0.82
26	NVLDKTYTEHLNKAGS	663	0.81

27	GHDMSHDITAGAKNVD	535	0.81
28	VRWENQHPEHDLKSYI	441	0.81
29	SGGTNGDVTFRGMFGS	90	0.80
30	IQVPVATDGADYLQSI	67	0.80
31	NGSYNLRKDIDVSVGI	646	0.80
32	TDRIQADLSAMYAWGK	565	0.80
33	WVEITGGKSDGESLYA	245	0.80
34	GNIVGYDLKPSKGFST	627	0.79
35	GAEAGIGYQFTDRIQA	555	0.79
36	VALGFTPDPENTWVEIT	234	0.78
37	KLTSEKPYRGQASVLL	167	0.78
38	TLHSLAPIVVTAQQGN	37	0.77
39	ANTGSAATVLFERQPE	151	0.77
40	ASEEQFNNIGRNYWVR	684	0.76
41	AQQGNDANGLIVHADP	48	0.76
42	MAMQVTRRTLNSRLAM	329	0.76
43	GARLDRVTVEDERADS	408	0.75
44	IEGQVNYSYNDHIMDN	290	0.75
45	PSAWKKWNADVALGFT	224	0.75
46	LGLLWRAVAEQNRVSL	609	0.74
47	FSLRTPPLVEMNHGGM	306	0.74
48	DGDGNTVPSAWKKWNA	217	0.74
49	KWSLITGVDSQFNKHG	350	0.73
50	GLVFAESEKNDAAETNT	22	0.73
51	DITAGAKNVDATIAGA	541	0.72
52	PLVEMNHGGMTMLMPN	312	0.72
53	DGSQFARESLGLRFEK	265	0.72

7.9 Análisis de estructura de proteínas

La disponibilidad de estructuras 3D de proteínas candidatas se verificó mediante el uso de un banco de datos de proteínas (PDB),

Si bien, los resultados analizados por ABCpred nos permitieron predecir una gran cantidad de epítomos, la desventaja de este método de predicción, es que se ignora por completo, que el reconocimiento de anticuerpos ocurre en proteínas plegadas en 3D. Para la predicción de epítomos basada en la estructura 3D usamos el software DiscoTope (Structure based antibody prediction), el cual nos permite obtener los complejos tridimensionales, la organización atómica y las coordenadas de los residuos de las proteínas a partir de los datos estructurales en 3D que se depositan en el banco de datos del PDB.

En la figura 17 se muestra la estructura 3D de las proteínas candidatas OmpA, Oxa-23, OprF, BamA, Bpl1, OprC y MotB, disponibles en el banco de datos del PDB (FilF no se encuentra caracterizada). Los epítomos predichos con mayor puntuación de cada proteína se observan como esferas rojas, para la proteína OmpA se marca la región de residuos 269-282 correspondientes a; HTDNTGPRKLNRL la cual mostro una puntuación máxima de 6.483 que representa la probabilidad de predicción de epítomos. Para Oxa-23 se marca la región de residuos 102-114 correspondientes a; KWKGEK con una puntuación máxima de 2.845. Para OprF se marca la región de residuos 50-62 correspondientes a; NQLTVKTPADNFN con una puntuación máxima de 2.003. Para la proteína BamA se marca la región de residuos 491-509 correspondientes a; YNVYYRKTCL NDDYVNNY con una puntuación máxima de 5.00. Para la proteína Bpl1 se marca la región de residuos 231-236 correspondientes a; TLSCLS con una puntuación máxima de 1.302. Para la proteína MotB se marca la región de residuos 102-114 correspondientes a; SRISPEQDHQVNA con una puntuación máxima de 6.493. Para la proteína OprC se marca la región de residuos 274-284 correspondientes a; LGLRFEK KNIT con una puntuación máxima de 12.886.

En los resultados obtenidos por DiscoTope, se observa en la figura 18 las gráficas correspondientes a las coordenadas de las regiones de residuos de epítomos de cada proteína. En la proteína OmpA, se observan al menos 5 regiones de residuos de epítomos discontinuos, en Oxa-23 se predijeron 10, para OprF se predijeron 5, en BamA se predijeron 14, para Bpl1; 3, para MotB; 7 y en la proteína OmpC se predijeron al menos 13.

Figura 17: Estructura 3D de proteínas inmunogénicas

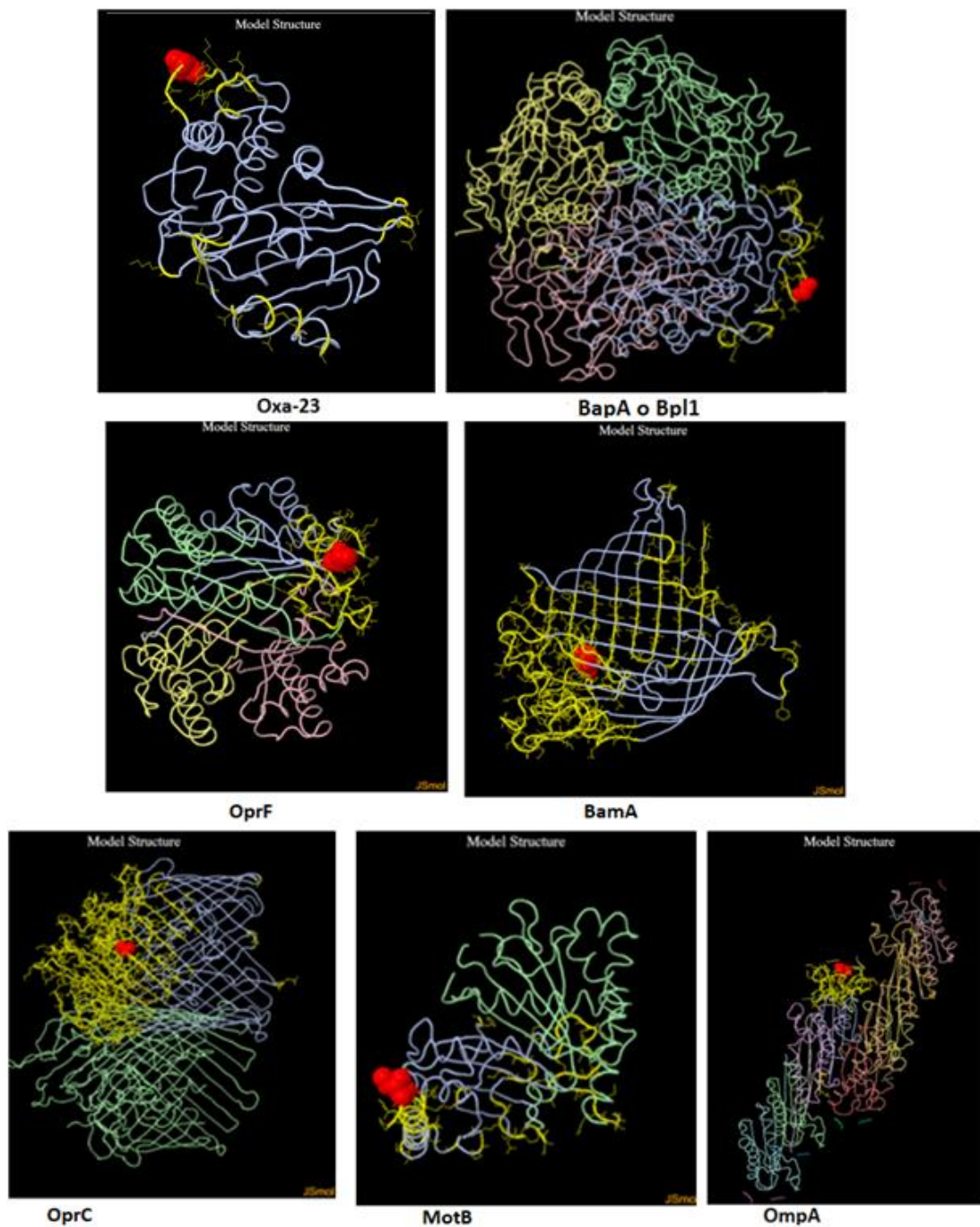


Figura 17: Estructura 3D obtenida a partir del programa de predicción DiscoTope. Se marca en rojo la región de aminoácidos con mayor puntaje de propensión.

Figura 18: Gráfica de las regiones de epítomos

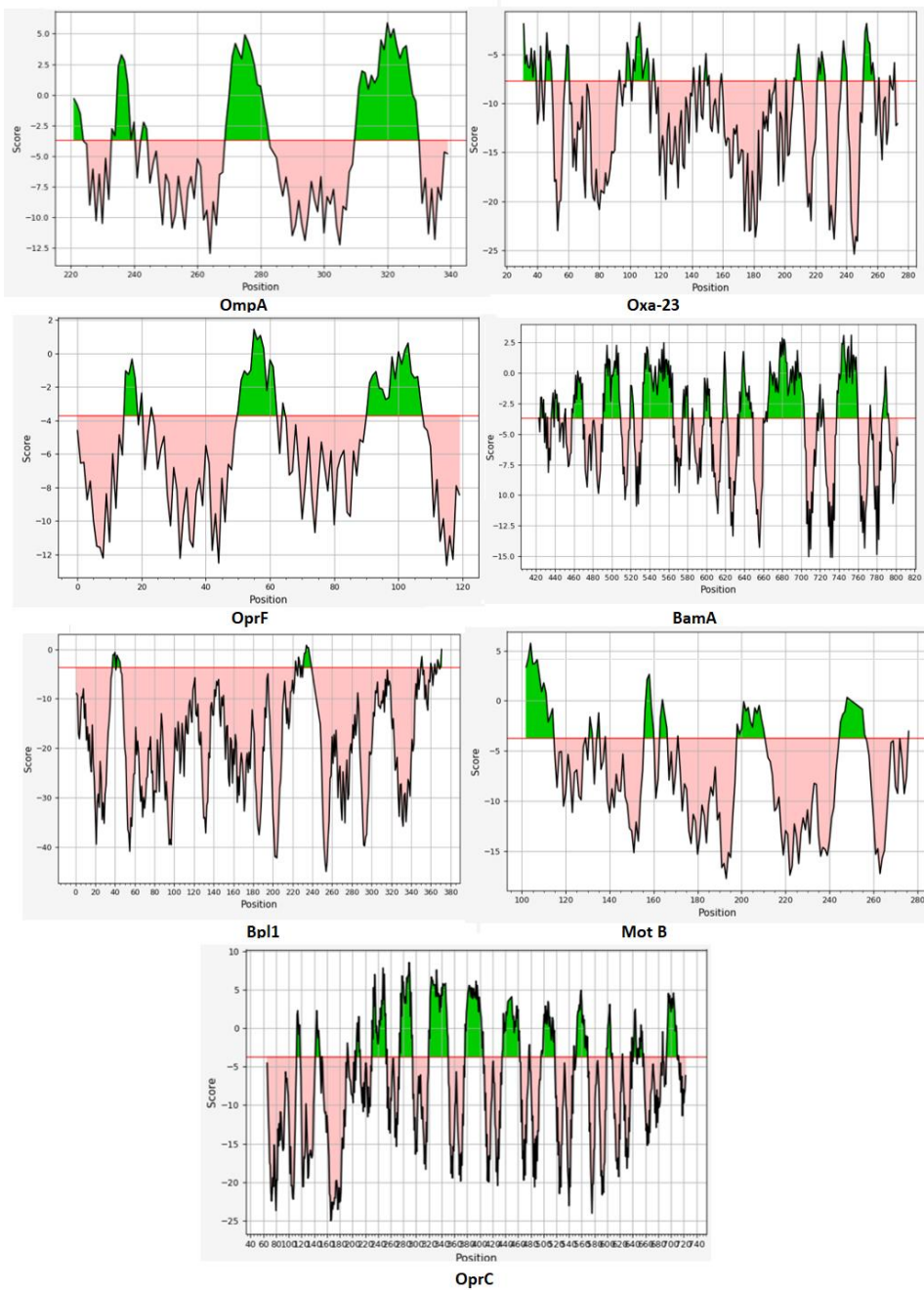


Figura 18: Resultados obtenidos de DiscoTope. Se muestra los valores de puntuación obtenidos a través de la secuencia. Rosa: representa puntuación más baja. Verde: puntuaciones que superan el umbral. Los picos representan las regiones con probabilidad alta de epítomos.

8. Discusión

La incapacidad para tratar de forma eficaz las infecciones por *A. baumannii* mediante métodos convencionales como el uso de antibióticos, junto con la emergente aparición de clones multirresistentes y la facilidad con la que este patógeno adquiere resistencia, ha provocado que se consideren nuevos enfoques de investigación como el desarrollo de vacunas (Harding *et al.*, 2018). En los últimos años se han probado diversos candidatos vacúnales basados en el uso de células enteras, vesículas de la membrana externa, componentes de la cápsula y a base de ADN, sin embargo, aún es limitado el potencial de éstos como vacunas debido a deficiencias en la seguridad y en las respuestas inmunogénicas (Chiang *et al.*, 2015). El diseño y selección de vacunas de origen proteico es una opción segura y eficaz para prevenir las infecciones por este patógeno.

El reconocimiento de proteínas candidatas a vacunas se centran en métodos de predicción *in silico* que se basan principalmente en la vacunación inversa, la cual se enfoca en los análisis de las secuencias del genoma, una vez que se seleccionan los genes que codifican proteínas cuyas características (como la localización celular y epítomos de células B) representan objetivos deseables como candidatos vacúnales, se realiza la producción de la proteína y el análisis en diversos modelos animales (Hassan *et al.*, 2016), estos métodos han permitido identificar diversas proteínas candidatas en *A. baumannii* incluidas AdeK, PonA, OmpA, FhuE, T6SS, MotB, TonB , proteína de ensamblaje de pilus P, chaperona de ensamblaje de pili (Hassan *et al.*, 2016).

Sin embargo, los métodos de predicción *in silico* no son capaces de predecir la accesibilidad de la superficie celular, por lo que es complicado y limitado determinar los antígenos que son reconocidos por el sistema inmunitario y que conducen realmente a una respuesta inmune protectora.

Un enfoque alternativo para la vacunación inversa podrían ser métodos que determinen de forma directa proteínas inmunogénicas. La inmunoproteómica ha surgido como un método que permite la detección de grandes paneles de proteínas inmunogénicas, que son considerados candidatos vacúnales directamente por la interacción con el sistema inmune. El trabajo realizado por Gang Li y colaboradores identificaron proteínas candidatas a vacuna contra *Haemophilus parasuis* a través de un enfoque inmunoproteómico (Gang Li et al., 2017). En este estudio utilizamos inmunoproteómica para identificar antígenos inmunogénicos de cepas con diferente perfil de resistencia de *A. baumannii*.

Recientemente, se han realizado diversos estudios que muestran una probable coinfección con microorganismos patógenos a nivel intrahospitalario. Un ejemplo son los estudios de coinfecciones en pacientes ingresados a la UCI con COVID-19, la cual es elevada siendo las bacterias, hongos y virus respiratorios los más abundantes. En este estudio se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra *A. baumannii*, una de las bacterias más importantes causante de neumonía asociada a ventilación mecánica además de ser uno de los patógenos más relevantes de infecciones asociadas a la atención de la salud, responsable del 20% de las infecciones en la UCI (Vincent *et al.*, 2009). Nuestros resultados mostraron que, del total de pacientes analizados, el 82% de los sueros contiene anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* 60 (Figura 13A) esta cepa muestra resistencia a antibióticos de amplio espectro como de espectro reducido que incluyen; Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Piperacilina-Tazobactam. El 84% de los sueros mostró anticuerpos contra la cepa *A. baumannii* 1 (Figura 13B) con resistencia a; Amikacina, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Imipenem, Meropenem, Meropenem, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Netilmicina, Tobramicina, Ticarcilina-Ácido Clavulánico, Cefotaxima, Doripenem que es un antibiótico de tipo carbapenémicos y la Colistina que es un antibiótico utilizado de última instancia para tratar infecciones polirresistentes contra *A. baumannii*. Y por último analizamos la

presencia de anticuerpos contra la cepa de referencia ATCC sin resistencia reportada, el 76% de los sueros mostraron anticuerpos.

Los resultados de este análisis nos permiten detectar la presencia y frecuencia de proteínas inmunogénicas, en los análisis llevados a cabo a partir de la cepa 60 observamos que en el 40% de los sueros se detectaron bandas con un tamaño >270 kDa que pueden corresponder a proteínas de alta talla molecular como; Blp1 (con una talla de 344 kDa), Bap (con una talla de 307 kDa) y Ata (206 kDa) que son proteínas sugeridas como candidatos vacúnales a partir de estudio de vacunación inversa (Hassan *et al.*, 2016). El 76% de los sueros presenta bandas que oscilan entre 52 y 66 kDa las cuales podrían corresponder a proteínas como; FilF (70 kDa), OprC (77 kDa), AdeK (52 kDa) y PKF (49 kDa) (Singh *et al.*, 2016, Hassan *et al.*, 2016 y Fajardo *et al.*, 2014).

En la cepa 1 las proteínas detectadas con mayor frecuencia (60%) oscilan entre 130 a 175 kDa, no se han reportado proteínas candidatos a vacuna contra *A. baumannii* con esa talla molecular. También se detectaron proteínas de 30 a 37 kDa y proteínas de 6.5 y 30 kDa con una frecuencia alta de 44%, estas bandas podrían corresponder a proteínas de baja talla molecular como; MotB (37 kDa), FilmA (32 kDa), CsuA/B (18 kDa), TonB (24 kDa), OmpA (38 kDa) y Oxa-23 (30 kDa) (Ramezanalizadeh F. *et al.*, 2020, Hassan *et al.*, 2016, Carvalho *et al.*, 2009 y Fajardo *et al.*, 2014).

En la cepa ATCC el 58% de sueros presenta bandas de 66 a 95 kDa que podrían corresponder a proteínas ya identificadas como; Omp87 (93 kDa), OprC (77 kDa), FilF (70 kDa), BamA (93 kDa), PonA (92 kDa) y FhunE (79 kDa). El 24% mostro bandas de entre 37 a 52 kDa que podrían corresponder a; OmpA (38 kDa), PKF (49 kDa), AdeK (52 kDa) y MotB (37 kDa). El 12% mostro bandas de 16 a 30 kDa; Oxa-23 (30 kDa), Omp22 (22 kDa), OprF (20 kDa), TonB (24) y CsuA/B (18 kDa) (Ramezanalizadeh F. *et al.*, 2020, Hassan *et al.*, 2016, Carvalho *et al.*, 2009, Fajardo *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2016 y Bahey *et al.*, 2020).

En algunos casos se observa un número bajo de bandas con el uso del suero de algunas muestras, este resultado puede deberse a las respuestas inmunes variadas en diferentes individuos, que se encuentran en estado inmunosuprimido normalmente, esta fase puede causar una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas respiratorias. El estado de inmunosupresión podría ser inducido por el virus Sars Cov-2y/o fármacos que aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias (Beadling C *et al.*, 2004), pero al mismo tiempo, la evidencia sugiere que algunos pacientes con COVID-19 podría sufrir un síndrome de tormenta de citosinas, caracterizada por un aumento de interleucina (IL) -2, IL-7, factor estimulante de colonias de granulocitos, proteína inducible por interferón- γ 10, proteína quimio atrayente de monocitos 1, proteína inflamatoria de macrófagos 1 - α , y factor de necrosis tumoral- α . Las citosinas inflamatorias producidas por estas células contribuyen a la inmunopatología letal, por lo que una de las estrategias terapéuticas es la administración de fármacos inmunosupresores, estas condiciones aumentan la susceptibilidad a infecciones secundarias (Sharifipour *et al.*, 2020)

Estos resultados mostraron la presencia de anticuerpos IgG contra *A. baumannii* que sugiere que el paciente sufrió una co-infección con este patógeno. Las infecciones secundarias con *A. baumannii* podrían agravar la enfermedad causando síntomas correspondientes a neumonía nosocomial que pueden elevar el riesgo de muerte por complicaciones respiratorias, en algunos casos se observó hasta el 90%, sin embargo, es difícil atribuir el total de muerte con la coinfección ya existen otros factores de riesgo que conducen a la muerte del paciente. Se requieren más estudios que nos permitan determinar todos los factores que influyan en el aumento de mortalidad en los pacientes (Pérez *et al.*, 2020).

A partir de los análisis de inmunotransferencia detectamos un total de 15 spots (Figura 15 y 16), que coincidían con los spots de proteína observadas en el gel 2-D.

La identificación teórica de las proteínas se basó en la búsqueda bibliográfica de las proteínas identificadas como candidatos a vacuna contra *A. baumannii* de los

últimos años, seleccionadas a partir de la coincidencia por punto isoeléctrico y talla molecular estimada. Éstos resultados nos permitieron generar una identificación teórica de 8 de los 15 spots detectados. Las proteínas inmunogénicas detectadas en este estudio incluyen proteínas de la membrana externa como: porinas, receptores celulares, adhesinas, proteínas estructurales, formadoras de biopelículas y proteínas asociadas los procesos de resistencia y virulencia bacteriana (Tabla 7).

OmpA es una de las proteínas que más atención a recibido como candidato a vacuna debido a sus numerosas funciones, participa en los procesos de resistencia antimicrobiana, formación de biopelículas, producción de apoptosis y la adhesión a células epiteliales. Nuestros análisis *in silico* demostraron que esta proteína podría corresponder al spot 14 identificado por nuestros ensayos de inmunodetección, por la coincidencia en pI y PM, el spot 19 mostro un PM aproximado de 37 kDa y un pI aproximado de 5.

Las proteínas de la membrana externa (Omp) juegan papeles clave en la patogénesis celular, las Omp identificadas en este estudio incluyen; OmpA, Omp87, OprF, Omp22 y OXA-23 (Fajardo *et al.*, 2014). Estas proteínas son altamente conservadas entre las especies de bacterias Gram negativas, participan en procesos de resistencia antimicrobiana, adherencia celular y la patogénesis. Las Omp son regularmente las más abundantes de la membrana externa en *A. baumannii*, capaces de sobresalir y atravesar la capa de polisacáridos, lo que les permite interactuar con el sistema inmunitario y por lo tanto son candidatos a vacunas apropiados (Hassan *et al.*, 2016).

Otros antígenos que no pertenecen a la familia de proteínas Omp, identificadas en este estudio incluyen proteínas que contribuyen a la formación de biopelículas, adherencia a las superficies bióticas y abióticas, detectamos una proteína con PM aproximado de 200 kDa y un pI de 7, fue identificado teóricamente como la proteína Ata. Esta proteína es exclusiva de *A. baumannii* que es usada para la adherencia a células epiteliales y proteínas de la matriz extracelular, esta proteína ya ha sido

probada como candidato a vacuna gracias a su alta conservación entre las especies de *A. baumannii* (Weidensdorfer *et al.*, 2015).

El spot 4 con PM mayor a 270 kDa y pl aproximado de 5, fue identificado como la proteína Blp1. Esta proteína participa en los procesos de adhesión celular y la formación de biopelículas. La proteína Blp1 de *A. baumannii* (también llamada BapA) se identificó recientemente, cuenta con una estructura tridimensional similar a la proteína Bap de *A. baumannii* (Skerniškytė *et al.*, 2019), fue identificado como candidato a vacuna a partir de estudios de vacunación inversa (Hassan *et al.*, 2016).

El spot 1, con PM aproximado de 95 kDa y pl de 5 fue identificado como BamA. BamA, el factor de ensamblaje de la membrana externa, BamA ya ha sido identificada en *A. baumannii* como candidato a vacuna por estudios de predicción *in silico*, esta proteína se encuentra altamente conservada (Hassan *et al.*, 2016).

Otro grupo de proteínas inmunogénicas que se identificaron en este estudio fueron algunos los componentes de los Pili. *A. baumannii* utiliza este mecanismo para la motilidad, adherencia celular y la competencia con otras bacterias. El spot 15 con PM 37 kDa y un pl estimado de 6, fue identificado como MotB, conocida como la proteína B de motilidad, forma parte del componente del motor flagelar y participa en la motilidad celular, esta proteína fue evaluada como candidato a vacuna a partir de estudios de predicción *in silico* (Hassan *et al.*, 2016).

El spot 6 con PM 70 kDa y un pl estimado de 6, fue identificado como FilF. FilF es una proteína de ensamblaje de pilus, se desconoce su papel exacto en la virulencia. Esta proteína fue seleccionada como candidato a vacuna por ensayos *in silico* gracias a su localización extracelular y elevada conservación (Singh *et al.*, 2016).

El spot 7 con PM aproximado de 20 kDa y un pl estimado de 6, fue identificado como OprF. La proteína F de la membrana externa, funciona como una porina con papeles importantes en la virulencia, esta proteína fue seleccionada como candidato a vacuna contra *P. aeruginosa*, por la presencia de su dominio de N-terminal de OprF por su interacción con el sistema inmune (Bahey *et al.*, 2020).

En este estudio también se identificaron proteínas asociadas a la resistencia antimicrobiana. El spot 8, con PM aproximado de 30 kDa y pl de 7, fue identificado como Oxa-23. Oxa-23 pertenece a las enzimas β -lactamasas de clase D, denominadas oxacilinasas (OXA), hidrolizan diferentes tipos de β lactámicos incluyendo carbapenémicos, Oxa-23 ha surgido a nivel mundial como uno de los principales mecanismos de resistencia en *A. baumannii* por lo que es un candidato a vacuna importante. El spot 10 con PM aproximado de 95 kDa y un pl estimado de 5 fue identificado como la proteína PonA, esta es una proteína de unión a la penicilina que participa en los procesos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos. La cepa en la que se reportó mostro resistencia a este tipo de antibióticos.

Los 7 Spots no identificados, corresponden a proteínas inmunogénicas no caracterizadas anteriormente como candidatos vacúnales, pero que evidentemente son proteínas que interactúan con el sistema inmunológico y que por lo tanto son proteínas inmunogénicas que deberán ser identificadas y podrían ser consideradas como candidatos vacúnales. De estas 9 proteínas se incluyen; Spot 3; PM: 52 kDa, pl: 4.5. Spot 5; PM: 95, pl:5. Spot 9; PM: 66, pl:5. Spot 10; PM:95, pl:5. Spot 11; PM:95, pl: 5.2. Spot 12; PM: 50kDa, pl: 5. Spot 13; PM:50, pl: 5.

Nuestros estudios de predicción de epítomos lineales y predicción basada en la estructura 3D, nos permiten sugerir que todas las proteínas inmunodetectadas, cuentan con al menos una región de reconocimiento de anticuerpos. Estos resultados son determinantes para una proteína propuesta como candidato a vacuna, el reconocimiento de epítomos en una proteína es esencial para el diseño y construcción de una vacuna, por lo que nuestros resultados se suman a la base de datos del potencial que juegan estas proteínas como candidatos a vacuna.

Para comprobar la identidad de los spots será necesario la identificación por MALDI-TOF, estos experimentos nos permitirán confirmar la identificación teórica realizada en el presente trabajo.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren ser proteínas que podrían funcionar como importantes candidatos a vacuna contra *A. baumannii*. Si bien, diversas proteínas han sido identificadas como candidatos a vacuna a partir de estudios de predicción *in silico* como la vacunación inversa, los ensayos inmunoproteómicos realizados en este estudio, nos permiten confirmar que solo algunas de las proteínas anteriormente seleccionadas interactúan con el sistema inmunológico por lo que son realmente proteínas inmunogénicas y potenciales candidatos a vacuna. Las caracterizaciones de estas proteínas, incluida la exposición superficial, la inmunogenicidad protectora, la amplia distribución, y las funciones esenciales en la patogenicidad, los convierten en excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas.

9. Conclusión

En este estudio logramos detectar proteínas inmunogénicas en *A. baumannii*, que incluyen proteínas de la membrana externa, porinas, receptores celulares, adhesinas, proteínas estructurales, proteínas utilizadas para la captación de nutrientes, formadoras de biopelículas y proteínas asociadas los procesos de resistencia.

Nuestros análisis basados en la búsqueda y caracterización de las proteínas inmunodetectadas, mostraron características fisicoquímicas que las convierten en proteínas candidatas a vacuna, como la presencia de múltiples regiones de interacción con anticuerpos, además de cumplir y participar en funciones esenciales en la patogenicidad y viabilidad celular.

Diversas proteínas han sido identificadas como candidatos a vacuna a partir de estudios de predicción *in silico* como la vacunación inversa, los ensayos inmunoproteómicos realizados en este proyecto, nos permiten confirmar que solo algunas de las proteínas anteriormente seleccionadas interactúan con el sistema inmunológico por lo que son realmente proteínas inmunogénicas y potenciales candidatos vacúnales.

Además, aunque hay algunos informes retrospectivos publicados recientemente de coinfecciones en pacientes con enfermedades de importancia clínica, como COVID-19. Nuestro estudio se suma a una base de evidencia creciente del papel que las coinfecciones bacterianas y su importancia en la actual pandemia de COVID-19. Nuestros hallazgos enfatizan la preocupación de la sobreinfección en pacientes intrahospitalarios y con susceptibilidad a adquirir la infección de COVID-19, debido a *Acinetobacter baumannii*. En consecuencia, es importante prestar atención a las coinfecciones bacterianas en pacientes críticos positivos para COVID-19, o en pacientes hospitalizados con otro tipo de infecciones o padecimientos.

10 Referencias

1. Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infection and drug resistance*, 13, 423–434.
2. Al Atrouni A., Hamze M., Jisr T., Lemarie C., Eveillard M., Joly-Guillou M. L. (2016). Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. *Int. J. Infect. Dis.* 52, 29–36.
3. Antunes L, Visca P, Kevin J. (2014). Towner, *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen, *Pathogens and Disease*, Volume 71, Issue 3, Pages 292–301.
4. Bahey-EI-Din M., Mohamed S.A., Sheweita S.A., Haroun M., Zaghloul T. I. (2020) Recombinant N-terminal outer membrane porin (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* is a promising vaccine candidate against both *P. aeruginosa* and some strains of *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2020; 310:151415.
5. Beadling C, Slifka MK. (2004). How do viral infections predispose patients to bacterial infections? *Curr Opin Infect Dis.*;17:185–191.
6. Bentancor L. V., Routray A., Bozkurt-Guzel C., Camacho-Peiro A., Pier G. B., Maira-Litran T. (2012). Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect. Immun.* 80, 3381–3388.
7. Bocanegra-Ibarias P, Pena-Lopez C, Camacho-Ortiz A, Llaca-Diaz J, Silva-Sanchez J, Barrios H, Garza-Ramos U, Rodriguez-Flores AM, Garza-Gonzalez E. (2015). Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *Int J Antimicrob Agents* 45:309–313
8. Bolourchi N., Shahcheraghi F., Shirazi A.S., Janani A., Bahrami F., Badmasti F. (2019). Immunogenic reactivity of recombinant PKF and AbOmpA proteins as

serum resistance factors against sepsis of *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Pathog.*;131:9–14.

9. Bouvert PJ, Grimont PA. (1986). Taxonomy of the genes *Acinetobacter*. *Int J Syst Bact.*; 361:228-40.
10. Breslow JM. (2011). Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infect Immun* 79, 3317–3327
11. Cabral MP. (2017). Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy. *Nat Commun* 8, 15480.
12. Carvalho, K. R.; Carvalho-Assef, A. P.; Peirano, G.; Santos, L. C.; Pereira, M. J.; Asensi, M. D. (2009). Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34, 25-28.
13. Chen C, Lin L, Chang Y, Chen Y, Chang C, Huang C. (2015). Infection Control Programs and Antibiotic Control Programs to Limit Transmission of Multi-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections: Evolution of Old Problems and New Challenges for Institutes. *International J Environm Res Publ Health* 12(8): 8871-8882.
14. Cheng, K., Chui, H., Domish, L., Hernandez, D., Wang, G. (2016). Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics Clin Appl.*; 10: 346–357.
15. Chiang, M. H., Sung, W. C., Lien, S. P., Chen, Y. Z., Lo, A. F., Huang, J. H., ... Chong, P. (2015). Identification of novel vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using reverse vaccinology. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(4), 1065–1073.
16. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. (2008). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* 8, 216.

17. Ciofu O. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal β -lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. *APMI*; 116:1–47.
18. Cisneros J.M., Rodriguez-Bano J. (2002). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, clinical features and treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(11), pp. 687-693.
19. Cosgaya C. (2016). *Acinetobacter* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 4105–4111,
20. Coyle J.R., Kaye K.S., Taylor T., Tansek R., Campbell M., Hayakawa K., Marchaim D. (2014). Effectiveness and cost of implementing an active surveillance screening policy for *Acinetobacter baumannii*: A Monte Carlo simulation model. *American Journal of Infection Control*, 42 (3), pp. 283-287
21. Darvishi M. (2016). Virulence factors profile and antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from various infections recovered from immunosuppressive patients. *Biomed. Pharmacol. J.* 9, 1057–1062.
22. Djordjevic Z, Folic M, Folic N, Gajovic N, Gajovic O, Jankovic S. (2016). Risk factors for hospital infections caused by carbapanem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect in Develop Countries*. 10 -10.
23. Fajardo Bonin R., Chapeaurouge A., Perales J., da Silva J. G., Jr., do Nascimento H. J., D'Alincourt Carvalho Assef A. P. (2014). Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. *Proteomics Clin. Appl.* 8, 916–923.
24. Fattahian Y., Rasooli I., Mousavi Gargari S.L., Rahbar M.R., Darvish Alipour Astaneh S., Amani J. (2011). Protection against *Acinetobacter baumannii* infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap) *Microb. Pathog*; 51:402–406.
25. Feng Z. (2014). Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. *Infect Immun* 82, 4458–4465.

26. Fiester S. E., Arivett B. A., Schmidt R. E., Beckett A. C., Ticak T., Carrier M. V. (2016). Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE 11:e0167068.
27. Fito-Boncompagni, L. Fito-Boncompagni, A. Chapalain, E. Bouffartigue, H. Chaker, O. Lesouhaitier, G. Gicquel, A. Bazire, A. Madi, N. Connil, W. Véron, L. Taupin, B. Toussaint, P. Cornelis, Q. Wei, K. Shioya, E. Déziel, M.G.J. Feuilloley, N. Orange, A. Dufour, S. Chevalier. (2011). Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF Infect. Immun., 79 (2011), pp. 1176-1186.
28. Gale AC, Jones RN, Forward KR, Liñares J, Sander HS, Verschoef J. (2001). Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: Geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-1999). Clin Infect Dis; 32 (Suppl 2): 104-113.
29. Gang Li, Fang X., Jianjun Li, Jiao L., Dapeng Li, Yanhe Z., Paul R., Yanwen Li, Siguo L., Chunlai W. (2017). Identification of novel *Haemophilus parasuis* serovar 5 vaccine candidates using an immunoproteomic approach, Journal of Proteomics. Volume 163, pag 111-117. ISSN 1874-3919.
30. Garg, N. y col. (2015). Immunoprotective potential of in silico predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb. Int. J. Med. Microbiol.
31. Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M. (2013). Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. J Proteome Res. 10.1021.
32. Gener-Smidt P. (1991). Reliability of phenotype tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol ;29(2):277-82.
33. Greene C, Vadlamudi G, Newton D, Foxman B & Xi C. (2016). The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. Am J Infect Control 44, e65–71.

34. Greene C, Wu J, Rickard AH & Xi C. (2016). Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Lett Appl Microbiol* 63, 233–239
35. Halachev MR, Chan JZ-M, Constantinidou CI. (2014). Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Birmingham, England. *Genome Med.* 6(11), 70.
36. Hassan A., Naz A., Obaid A., Paracha R. Z., Naz K., Awan F. M. (2016). Pangenome and immuno-proteomics analysis of *Acinetobacter baumannii* strains revealed the core peptide vaccine targets. *BMC Genomics.* 17:732.
37. Harding, C. M., Hennon, S. W., & Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature reviews. Microbiology*, 16(2), 91–102.
38. Harding C. M., Kinsella R. L., Palmer L. D., Skaar E. P., Feldman M. F. (2016). Medically relevant *Acinetobacter* species require a type II secretion system and specific membrane-associated chaperones for the export of multiple substrates and full virulence. *PLoS Pathog.* 12:e1005391.
39. Higgin PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. (2007). A PCR- base method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect.* 13: 1199-201.
40. Huang W., Yao Y., Long Q., Yang X., Sun W., Liu C. (2014). Immunization against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. *PLoS ONE* 9:e100727.
41. Huang W., Yao Y., Wang S., Xia Y., Yang X., Long Q. (2016). Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* 6:20724.
42. Imperi F., Antunes L. C. S., Blom J., Villa L., Iacono M., Visca P. (2011). The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life* 63 1068–1074.

43. Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K. (1997). Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol.* 47:1179-87.
44. Juttukonda L. J., Chazin W. J., Skaar E. P. (2016). *Acinetobacter baumannii* coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation. *MBio* 7:e01475–16.
45. Karah N, Dwibedi C, Sjöström K, Edquist P, Johansson A, Wai S. Karah N. (2016). Novel Aminoglycoside Resistance Transposons and Transposon-Derived Circular Forms Detected in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 60(3): 1801-1818.
46. Kim S. W., Choi C. H., Moon D. C., Jin J. S., Lee J. H., Shin J. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 301, 224–231.
47. Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 55.
48. Lee C. H., Tang Y. F., Su L. H., Chien C. C., Liu J. W. (2008). Antimicrobial effects of varied combinations of meropenem, sulbactam, and colistin on a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate that caused meningitis and bacteremia. *Microb. Drug Resist.* 14, 233–237.
49. Li Z. T., Zhang R. L., Bi X. G., Xu L., Fan M., Xie D. (2015). Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. *Microb. Pathog.* 81, 46–52.
50. Lin M. F., Lan C. Y. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World J. Clin. Cases.* 2, 787–814
51. Luo G., Lin L., Ibrahim A.S., Baquir B., Pantapalangkoor P., Bonomo R.A., Doi Y., Adams M.D., Russo T.A., Spellberg B. (2012). Active and Passive Immunization Protects against Lethal, Extreme Drug Resistant-*Acinetobacter baumannii* Infection. *PLoS ONE*;7:e29446.

52. Maragakis LL, Perl TM. (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. Clin Infect Dis. 46:1254-63
53. March C. (2010). Dissection of host cell signal transduction during *Acinetobacter baumannii*-triggered inflammatory response. PLoS One 5, e10033.
54. Martínez-Pellús A, Ruíz J, Jaime F, Simarro E, Fernández A. (2002). Incidencia de colonización e infección por *Acinetobacter baumannii* en una UCI con situación de endemia. Análisis de factores de riesgo mediante un estudio de vigilancia. Enferm Infecc Microbiol Clin; 20(5): 194-9
55. Smani Megeed A. A., Hayssam M. A., Salem M. Z., El-Shikh M. S., Talea I. A., Alogaibi Y. A. (2016). Investigation of the virulence factors and molecular characterization of the clonal relations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. J. AOAC Int. 16-0139.
56. Mujawar, S., Mishra, R., Pawar, S., Gatherer, D., & Lahiri, C. (2019). Delineating the Plausible Molecular Vaccine Candidates and Drug Targets of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 9, 203.
57. Noto MJ. (2015). Toll-Like Receptor 9 Contributes to Defense against *Acinetobacter baumannii* Infection. Infect Immun 83, 4134–4141.
58. Nowak P, Paluchowska P. (2016). *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. VIA MEDICA.; 54-2.
59. Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clinical microbiology reviews, 21(3), 538–582.
60. Perez F., Hujer A. M., Hujer K. M., Decker B. K., Rather P. N., Bonomo R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3471–3484.
61. Perez, S., Innes, G. K., Walters, M. S., Mehr, J., Arias, J., Greeley, R., & Chew, D. (2020). Increase in Hospital-Acquired Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection and Colonization in an Acute Care Hospital During a Surge

in COVID-19 Admissions - New Jersey, February-July 2020. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 69(48), 1827–1831.

62. Piepenbrink KH. (2016). Structural Diversity in the Type IV Pili of Multidrug-resistant *Acinetobacter*. *J Biol Chem* 291, 22924–22935.
63. Pleșca CE, Luca MC, Luca AS, Constantinescu S, Iancu LS. (2015). Etiology and resistance profile of isolated strains from severe systemic infections in patients with immunodepression--experience of the IASI infectious diseases hospital 2011-2014. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*; 119(4): 1141-6.
64. Qamsari, M. M., Rasooli, I., Chaudhuri, S., Astaneh, S., & Schryvers, A. B. (2020). Hybrid Antigens Expressing Surface Loops of ZnuD from *Acinetobacter baumannii* Is Capable of Inducing Protection Against Infection. *Frontiers in immunology*, 11, 158.
65. Ramezanalizadeh F., (2020). Owlia P., Rasooli I. Type I pili, CsuA/B and FimA induce a protective immune response against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*. ; 38:5436–5446.
66. Rasooli, I., Abdolhamidi, R., Jahangiri, A., & Darvish Alipour Astaneh, S. (2020). Outer Membrane Protein, Oma87 Prevents *Acinetobacter baumannii* Infection. *International journal of peptide research and therapeutics*, 1–8.
67. Ribera A., Roca I., Ruiz J., Gibert I., Vila J. (2003). Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 477–480.
68. [Rocha I.V.](#), [Xavier DE](#), [Almeida K.](#), [Oliveira](#), [Leal N.](#) (2018). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clones persist on hospital inanimate surfaces. [Braz J Infect Dis.](#) ;22(5):438-441.
69. Rodríguez CH. (2018). Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol*.
70. Rumbo C., Tomas M., Fernandez Moreira E., Soares N. C., Carvajal M., Santillana E. (2014). The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect. Immun.* 82, 4666–4680.

71. Russo T. A., Manohar A., Beanan J. M., Olson R., MacDonald U., Graham J. (2016). The response regulator BfmR is a potential drug target for *Acinetobacter baumannii*. *mSphere* 1: e00082–16.
72. Scott NE. (2014). Diversity within the O-linked protein glycosylation systems of *Acinetobacter* species. *Mol Cell Proteomics* 13, 2354–2370.
73. Sharifipour, E., Shams, S., Esmkhani, M., Khodadadi, J., Fotouhi-Ardakani, R., Koochpaei, A., Doosti, Z., & Ej Golzari, S. (2020). Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC infectious diseases*, 20(1), 646.
74. Sheweita S.A., Batah A.M., Ghazy A.A., Hussein A., Amara A.A. (2019). A new strain of *Acinetobacter baumannii* and characterization of its ghost as a candidate vaccine. *J. Infect. Public Health.* ; 12:831–842.
75. Shiralizadeh S, Taghizadeh S, Asgharzadeh M. (2018). Urinary tract infections: raising problem in developing countries. *Rev Med Microbiol.* Pp 159–165.
76. Singh, R., Capalash, N., & Sharma, P. (2017). Immunoprotective potential of BamA, the outer membrane protein assembly factor, against MDR *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*, 7(1), 12411.
77. Singh, R., Garg, N., Shukla, G., Capalash, N., & Sharma, P. (2016). Immunoprotective Efficacy of *Acinetobacter baumannii* Outer Membrane Protein, FilF, Predicted in silico as a Potential Vaccine Candidate. *Frontiers in microbiology*, 7, 158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00158>
78. Skerniškytė, J., Karazijaitė, E., Deschamps, J., Krasauskas, R., Armalytė, J., Briandet, R., & Sužiedėlienė, E. (2019). Blp1 protein shows virulence-associated features and elicits protective immunity to *Acinetobacter baumannii* infection. *BMC microbiology*, 19(1), 259
79. Smani Y., Fabrega A., Roca I., Sanchez-Encinales V., Vila J., Pachon J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1806–1808
80. Smani Y., McConnell M. J., Pachon J. (2012). Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS ONE* 7:e33073.

81. Tabrizi CA, Walcher P, Mayr UB, Stiedl T, Binder M, McGrath J, Lubitz W. (2004). Bacterial ghosts--biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Dec; Curr Opin Biotechnol.* 15(6):530-7.
82. Tada T., Miyoshi-Akiyama T., Shimada K., Shimojima M., Kirikae T. (2014). Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase coproducers in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2916–2920.
83. Tajeddin E., RashidanM., Razaghi M. (2016). The role of the intensive care unit environment and health-care workers in the transmission of bacteria associated with hospital acquired infections. *J Infect Public Health*, pp. 9.
84. Thompson MG. (2014). Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1332–1342.
85. Traglia G. M., Chua K., Centron D., Tolmasky M. E., Ramirez M. S. (2014). Whole-genome sequence analysis of the naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate A118. *Genome Biol. Evol.* 6, 2235–2239.
86. Torres HA, Vazquez EG, Yague G, Gomez JG. (2010). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights. *Rev Esp Quimioter.* 23:12-9.
87. Touchon M. (2014). The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol Evol* 6, 2866–2882.
88. Viehman, J. A., Nguyen, M. H., & Doi, Y. (2014). Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*, 74(12), 1315–1333.
89. Vincent J. L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C. D. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302, 2323–2329.

90. Wang N., Ozer E. A., Mandel M. J., Hauser A. R. (2014). Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. *MBio* 5, e01163–14.
91. Weidensdorfer M. (2015). Analysis of Endothelial Adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* Using a Dynamic Human Ex Vivo Infection Model. *Infect Immun* 84, 711–722.
92. Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.*
93. Wong D. (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev* 30, 409–447.
94. World Health Organization. (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. Geneva: World Health Organization. 10 p.
95. Zahedi Bialvaei A, Samadi Kafil H, Ebrahimzadeh Leylabadlo H, Asgharzadeh M, Aghazadeh M. (2015). Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. *Iran J Microbiol*. Pp 226–246.
96. Zhang X., Yang T., Cao J., Sun J., Dai W., Zhang L. (2016). Mucosal immunization with purified OmpA elicited protective immunity against infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Pathog*; 96:20–25.