

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* de origen hospitalario”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Química Clínica Diagnóstica

Presenta
Francisco Benavides Correa

Dirigido por:
Dra. María Carlota García Gutiérrez

Centro Universitario, Querétaro, Qro. a enero de 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos
del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*
de origen hospitalario

por

Francisco Benavides Correa

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-196611



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

**“Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos del complejo
Acinetobacter calcoaceticus-baumannii de origen hospitalario”**

Tesis

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

Presenta
Francisco Benavides Correa

Dirigido por:
Dra. María Carlota García Gutiérrez

Dra. María Carlota García Gutiérrez
Presidente

Firma

Dr. Juan Campos Guillén
Secretario

Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Vocal

Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez
Suplente

Firma

Dr. Miguel Francisco Javier Lloret Rivas
Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero 2024
México

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico recibido para poder cursar la Maestría en Química Clínica Diagnóstica, con CVU 927160.

Al Fondo para el Desarrollo del Conocimiento (FONDEC-UAQ) por el apoyo económico recibido para la realización de esta tesis, a partir del proyecto con registro FME202204.

A la Unidad de Servicios Clínicos y Diagnóstico Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, por proporcionar las instalaciones y el equipamiento necesario, siendo parte esencial para el desarrollo de este proyecto.

A la Secretaría de Salud del Estado de Querétaro (SESEQ), en especial a la Q.F.B. Rocío Alejandra Romero Mejía, por todo el apoyo brindado para la obtención de las muestras con las cuales se trabajó en este proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia, mis padres, Gustavo Benavides y Bárbara Correa, por haberme brindado su apoyo y amor incondicional, por estar siempre a mi lado y motivarme a no desistir en momentos difíciles.

A mi prometida, Daniela Jiménez Balderas, por ser mi compañera de maestría y de vida, por darme toda la fuerza y motivación necesaria, y estar conmigo en todas las horas de desvelo para seguir adelante día a día, con todo el amor y cariño.

A mi directora de tesis, la Dra. Carlota, por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo, por toda su dedicación, tiempo invertido y disponibilidad para atender cualquier duda o comentario.

A mi comité sinodal, al Dr. Juan Campos, por toda la orientación brindada para poder desarrollar la parte molecular de este trabajo. A la Dra. Bertha Carvajal y al Dr. Gerardo Nava, por todos los comentarios realizados durante el posgrado que beneficiaron positivamente este trabajo llevándolo a un nivel superior en calidad. Al Dr. Miguel Lloret, por los consejos brindados y tener la disponibilidad para mejorar este trabajo.

A mis compañeros de maestría, por el apoyo académico y la amistad forjada con cada uno de ellos durante este posgrado.

Índice general

Índice general	I
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	1
Abstract	3
1 Introducción	4
2 Antecedentes	6
2.1 Características generales	6
2.2 Complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	6
2.3 Patogénesis	7
2.4 Resistencia a antimicrobianos	8
2.4.1. Resistencia a aminoglucósidos	8
2.4.2. Resistencia a beta-lactámicos	8
2.4.3. Resistencia a cefalosporinas	10
2.4.4. Resistencia a polimixinas	10
2.4.5. Resistencia a carbapenémicos	11
2.5 Clasificación de la multirresistencia a antimicrobianos	12
2.6 Factores de virulencia	14
2.7 Panorama mundial	16
2.8 Panorama en México	17
3 Objetivos	19
3.1 General	19
3.2 Específicos	19
3.3 Profesionalizantes	19
4 Metodología	20
4.1. Diseño experimental	20

4.1.1.	Definición del Universo	20
4.1.2.	Tamaño de muestra	20
4.1.3.	Criterios de inclusión	20
4.1.4.	Criterios de exclusión	20
4.1.5.	Criterios de eliminación	20
4.1.6.	Definición de las variables y unidades de medida	21
4.2.	Procedimientos	22
4.2.1.	Conservación y resiembra de los aislamientos clínicos	22
4.2.2.	Identificación del perfil ampliado de resistencia	22
4.2.3.	Clasificación del grado de multirresistencia	22
4.2.4.	Extracción de ADN	24
4.2.5.	Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos	24
4.2.6.	Determinación de la capacidad de formación de biopelícula	26
4.2.7.	Determinación del tipo de motilidad	27
4.2.8.	Determinación de la actividad bactericida del suero	28
4.2.9.	Diferenciación molecular de <i>A. baumannii</i> por PCR de los genes <i>bla</i> _{OXA-51-like} y <i>rpoB</i> .	29
4.3.	Procesamiento de datos y análisis estadístico	31
5	Resultados	32
5.1.	Identificación del perfil ampliado de susceptibilidad	33
5.2.	Clasificación del grado de multirresistencia	35
5.3.	Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos	37
5.4.	Determinación de la capacidad de formación de biopelícula	40
5.5.	Determinación del tipo de motilidad.	40
5.6.	Determinación de la actividad bactericida del suero	42
5.7.	Análisis de los Factores de Virulencia	42
5.8.	Diferenciación molecular de <i>A. baumannii</i> por PCR de los genes <i>bla</i> _{OXA-51-like} y <i>rpoB</i>	44
6	Discusión	47
7	Conclusiones	56
8	Referencias	58
9	Anexos	72

9.1.	Extracción de ADN para bacterias Gram negativas.	72
9.2.	Preparación de agar LB Swarming	73
9.3.	Preparación de agar LB Twitching	74
9.4.	Preparación de solución TM	74
9.5.	Resultados perfil ampliado de resistencia	75
9.6.	Secuencia de genes utilizados en este estudio	76

Índice de tablas

Tabla 1. Categorías de antimicrobianos y agentes antimicrobianos usados para definir MDR, XDR y PDR en <i>Acinetobacter spp</i> (Magiorakos et al., 2012).	13
Tabla 2. Criterios para la definición de la multirresistencia en <i>Acinetobacter spp</i> (Magiorakos et al., 2012).	13
Tabla 3. Definición de las variables y unidades de medida	21
Tabla 4. Categorías de antimicrobianos evaluadas para <i>Acinetobacter sp.</i>	23
Tabla 5. Oligonucleótidos por utilizar en este estudio.	25
Tabla 6. Clasificación según la formación de biopelícula.	27
Tabla 7. Oligonucleótidos específicos usados para la identificación de los genes <i>bla_{oxa-51-like}</i> y <i>rpoB</i> .	30
Tabla 8. Distribución de aislamientos del complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> obtenidos en los servicios hospitalarios.	32
Tabla 9. Distribución de aislamientos del complejo ACB según el tipo de muestra biológica del cual fue obtenido.	33
Tabla 10. Frecuencia de aislamientos del complejo ACB susceptibles, intermedios y resistentes a los antimicrobianos analizados.	34
Tabla 11. Patrones de resistencia observados en los aislamientos del complejo ACB.	37
Tabla 12. Genes productores de betalactamasas identificados.	38
Tabla 13. Diseño de cebadores para la amplificación de genes productores de carbapenemasas.	38
Tabla 14. Prevalencia de genes productores de carbapenemasas en aislamientos del complejo ACB.	40
Tabla 15. Distribución de la formación de biopelícula en aislamientos del complejo ACB.	40

Tabla 16. Frecuencia de tipos de motilidad presentada por los aislamientos del complejo ACB.	42
Tabla 17. Resultados de la identificación por MLST.	45

Índice de figuras

Figura 1. Descripción gráfica del programa de amplificación a seguir para la identificación de genes de resistencia a carbapenémicos.	25
Figura 2. Preparación de la microplaca para la prueba del efecto bactericida del suero para cada aislamiento.	29
Figura 3. Descripción gráfica del programa de amplificación utilizado para la diferenciación molecular de <i>A. baumannii</i> del resto del complejo ACB.	30
Figura 4. Distribución de los aislamientos del complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> en los hospitales participantes.	32
Figura 5. Porcentaje de aislamientos del complejo ACB no susceptibles a las diferentes categorías de antimicrobianos probadas.	35
Figura 6. Clasificación de la multirresistencia de aislamientos del complejo ACB.	36
Figura 7. A) Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en aislamiento de referencia. B y C) Identificación de los genes <i>OXA-24-like</i> y <i>OXA-51-like</i> en muestras representativas.	39
Figura 8. Prueba de motilidad presente en los aislamientos del complejo ACB	41
Figura 9. Distribución de los factores de virulencia dentro de los aislamientos del complejo ACB.	43
Figura 10. Distribución del número de factores de virulencia presentes en los aislamientos del complejo ACB de acuerdo con su multirresistencia.	44
Figura 11. imágenes representativas de la identificación de los genes <i>rpoB</i> (A) y <i>bla_{OXA-51-like}</i> (B) en muestras representativas.	46
Figura 12. A) Distribución de los servicios de procedencia de los aislamientos del complejo ACB de acuerdo con su multirresistencia. B) Distribución del sitio de origen de muestra de los aislamientos del complejo ACB de acuerdo con su multirresistencia.	50

Figura 13. Porcentaje de aislamientos del complejo ACB resistentes a los diferentes antimicrobianos indicados para la clasificación de su multirresistencia, se incluyen los antimicrobianos probados por los laboratorios de los hospitales participantes, así como aquellos probados en este trabajo.

75

Abreviaturas

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
ECDC	Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades
MDR	Multidrogorresistente
XDR	Con resistencia extrema
PDR	Pandrogorresistente
ACB	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
LB	Caldo Lisogénico
LBA	Agar Lisogénico
BHI	Infusión Cerebro Corazón
MH	Mueller-Hinton
DO	Densidad Óptica
DOL	Límite de la Densidad Óptica
PSH	Pool de Suero Humano
PSH-IC	Pool de Suero Humano inactivado por calor
F.V.	Factor de Virulencia
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TAE	Tris/Acetato/EDTA
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
MI	Medicina Interna
MLST	Tipificación de Secuencias Multi Locus
ST	Secuencia Tipo
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica

Resumen

Las infecciones asociadas a la atención sanitaria causadas por el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) se han convertido en un problema emergente de salud pública mundial, debido a los altos niveles de resistencia a múltiples fármacos, que dejan pocas opciones de tratamiento disponibles; además, su capacidad de permanencia dentro de las instalaciones hospitalarias. Así, el complejo ACB se ha convertido en un importante desafío terapéutico, y se ha posicionado como una de las mayores amenazas tanto a nivel global como local. El objetivo de este trabajo fue la caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos del complejo ACB de origen hospitalario. Los aislamientos se obtuvieron de hospitales estatales durante el periodo de noviembre de 2018 a diciembre de 2019, se realizó perfil de resistencia a antimicrobianos y categorización multirresistencia; Se identificaron genes productores de carbapenemasas y se realizaron pruebas fenotípicas para determinar la presencia de algunos factores de virulencia: biopelícula, motilidad y resistencia al suero; Por último, se diferenció a *Acinetobacter baumannii* del complejo ACB. Se caracterizaron 54 aislamientos; la mayoría de las cepas se recuperaron de pacientes en la unidad de cuidados intensivos (39%) y medicina interna (19%). y de secreciones bronquiales (54%) y hemocultivos (30%). Además, el 9% eran multirresistentes y el 83% presentaron resistencia extrema a los medicamentos (XDR). Entre los resultados más destacados, identificamos un aislado pandrogos-resistente; 5 cepas XDR que expresaron 4 factores de virulencia de UCI (66%) y secreciones bronquiales (100%); y 6 aislados XDR con 3 factores de virulencia procedentes de UCI (66%) recuperados de secreciones bronquiales (50%) y hemocultivos (33%). Además, identificamos la presencia de genes productores de carbapenemasas tipo *bla*_{OXA-24-like} (46%), *bla*_{TEM} (4%) y diferenciamos a *Acinetobacter baumannii* del complejo ACB mediante la identificación de genes tipo *bla*_{OXA-51-like} y *rpoB* en todos los aislamientos. Estos resultados sugieren que la presencia de cepas con resistencia extrema, que presentan genes de resistencia y diversos factores de virulencia, representa un grave problema de salud en el estado, el cual debe contar con una mejor vigilancia epidemiológica para establecer medidas preventivas y de control en beneficio de la salud pública local.

Palabras clave: *Acinetobacter*, multirresistencia, virulencia.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos de esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto 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.

Abstract

Healthcare Associated Infections caused by the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB) complex have become an emerging global public health problem, due to the high levels of multidrug resistance, that leave few treatment options available; and furthermore, their ability to persist within hospital facilities. Thus, the ACB complex has become an important therapeutic challenge, and it has positioned itself as one of the greatest threats both globally and locally. The aim of this study was to characterize clinical ACB complex isolates at the phenotypic and molecular level. Isolates were obtained from state hospitals during the period from November 2018 to December 2019, antimicrobial resistance profile and multiresistance categorization was performed; carbapenemase-producing genes were identified, and phenotypic tests were performed for determining the presence of some virulence factors: biofilm, motility, and serum resistance. Fifty-four isolates of the ACB complex were characterized; most strains were recovered from patients in the intensive care unit (39%) and internal medicine (19%), and from Bronchial secretions (54%) and blood cultures (30%). In addition, 9% were multidrug-resistant and 83% were extensively drug-resistant isolates (XDR). Among the most outstanding results, we identified a pandrug-resistant isolate; 5 XDR strains that expressed 4 virulence factors from the ICU (66%) and bronchial secretions (100%); and 6 XDR isolates with 3 virulence factors from the ICU (66%) recovered from bronchial secretions (50%) and blood cultures (33%). Furthermore, we identified the presence of carbapenemase-producing genes *bla*_{OXA-24-like} (46%), *bla*_{TEM} (4%), and differentiated *Acinetobacter baumannii* from the ACB complex by identifying *bla*_{OXA-24-like} and *rpoB* genes in all isolates. These results suggest that the presence of strains with extreme resistance, which present multiple resistance genes and the expression of various virulence factors represents a serious health problem in the state, which must have better epidemiological surveillance to establish preventive and control measures for the benefit of our local public health.

Keywords: *Acinetobacter*, multiresistance, virulence.

1 Introducción

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) son aquellas que se contraen en los establecimientos de salud, incluidos hospitales u otro centro sanitario y se presentan posterior a las 48 horas de admisión. Este tipo de infecciones son el evento adverso más frecuente durante la prestación de atención sanitaria y se han convertido en un problema de salud pública mundial. El creciente número de patógenos resistentes a múltiples antimicrobianos, atribuible de manera importante a este tipo de infecciones, representan un gran desafío para los centros de atención de la salud, causando un incremento en la aparición de brotes difíciles de controlar, así como en las tasas de morbilidad y elevando los costos de la atención (Santajit & Indrawattana, 2016).

De estos patógenos emergentes, *Acinetobacter* se ha convertido en un problema emergente de salud pública mundial, esto aunado a la resistencia intrínseca que presentan a múltiples antimicrobianos y la habilidad de adquirir y diseminar genes de resistencia, que los ha convertido en un importante desafío terapéutico, afectando principalmente a aquellos pacientes inmunocomprometidos o con largas estancias dentro de las instalaciones hospitalarias (Wong et al., 2017).

Asimismo, estos microorganismos poseen mecanismos de patogenicidad específicos, incluyendo determinantes de virulencia, que les permiten superar las defensas de un hospedero además de características que les otorgan capacidad de poder sobrevivir en el medio ambiente, lo que ha contribuido a su transmisión y persistencia dentro de los centros de atención médica a nivel mundial (O'Donnell et al., 2021).

Dentro de las infecciones causadas por el género *Acinetobacter*, existe un grupo de 6 especies que ha sido denominado como complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB), dentro del cual *Acinetobacter baumannii* es

considerado el de mayor relevancia clínica esto debido a que es el agente causal de la mayoría de las IAAS en pacientes con enfermedades críticas o que se encuentran inmunocomprometidos a nivel mundial (Mancilla-Rojano et al., 2020).

El manejo de las infecciones provocadas por *Acinetobacter baumannii* es muy complicado debido a las pocas o nulas opciones de tratamiento disponible por la gran cantidad de mecanismos de resistencia que puede presentar. Uno de estos mecanismos de mayor preocupación es la resistencia a carbapenémicos, que lo ha posicionado como una de las mayores amenazas dentro de la lista de patógenos resistentes definida por la Organización Mundial de la Salud y Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, al ser este grupo de antimicrobianos considerado como última opción de tratamiento para este tipo de infecciones (Bagińska et al., 2021).

Al mismo tiempo, estos microorganismos pueden producir factores de virulencia específicos que les otorgarán las características necesarias para poder invadir el ambiente del hospedero, desde su adhesión y colonización, hasta la evasión de la respuesta inmune y daño tisular, dificultando las estrategias a seguir para su control y prevención dentro de los ambientes hospitalarios (Harding et al., 2018).

En la Ciudad de Querétaro a pesar de su importancia como patógenos emergentes, las características tanto fenotípicas como moleculares de resistencia a antimicrobianos y presencia de factores de virulencia en el proceso de la enfermedad aún son pobremente estudiadas, por lo que es de interés conocer el rol patogénico de los mismos, pues estos factores pueden aumentar la transmisión y persistencia de este tipo de infecciones de difícil manejo. En el presente trabajo se realizará la caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* de origen hospitalario.

2 Antecedentes

2.1 Características generales

Las bacterias de género *Acinetobacter* son bacterias Gram negativas oportunistas que generalmente habitan en el suelo y las superficies presentes en ambientes húmedos, pero la adaptabilidad que presentan les ha permitido sobrevivir en una gran variedad de superficies bióticas y abióticas, tales como aquellas presentes en las instalaciones médicas (Wong et al., 2017).

Acinetobacter es un cocobacilo estrictamente aerobio, catalasa positivo, indol negativo, oxidasa negativo y citrato positivo, que presenta una temperatura óptima de crecimiento entre 33 - 40°C. Sus colonias presentan un color cremoso, de textura suave o mucoide cuando se encuentra la presencia de cápsula (Almasaudi, 2018).

2.2 Complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

Dentro del género *Acinetobacter*, existe un grupo de 6 especies formado por *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* y *A. dijkshoorniae*, que ha sido denominado como complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ACB), esto debido a que estas 6 especies no se pueden distinguir a través de métodos bioquímicos por lo que es necesario el uso de métodos moleculares para su diferenciación (Mancilla-Rojano et al., 2020).

Dentro de este complejo, *A. baumannii* es causante de la mayoría de las IAAS en pacientes con enfermedades críticas o que se encuentran inmunocomprometidos, además de encontrarse también dentro de los ambientes hospitalarios, sobre todo dentro de las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), en donde son frecuentemente aislados de equipo médico reutilizable como ventiladores, humidificadores, lavabos y orinales (Antunes et al., 2014) y de superficies abióticas como camas, cortinas, paredes y pertenencias del personal de salud, debido a la capacidad que tienen para sobrevivir en condiciones no óptimas (Asif et al., 2018).

Estas características observadas en esta especie en especial, han llevado al desarrollo de diversos métodos moleculares para la diferenciación de estas

especies, tales como la identificación de la secuencia específica del gen *bla*_{OXA-51-like}, los genes *gyrB* y *rpoB*, la secuenciación del gen 16S rRNA y del espaciador transcrito interno de la región 16S-23S del ARN ribosomal, siendo esta técnica una de las mejores como método de identificación (Mancilla-Rojano et al., 2020).

Asimismo, la identificación de los perfiles proteicos característicos de cada cepa por medio del sistema de espectrometría de masas y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI TOF-MS) han surgido como una herramienta para la diferenciación a nivel de especies, pero este es un método costoso (Abhari et al., 2021).

Varios estudios han demostrado la utilidad que presenta la secuenciación del gen que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*) para la identificación y la clasificación taxonómica de varias especies bacterianas (La Scola et al., 2006). Como resultado, un estudio reciente describió la diferenciación de *A. baumannii* del complejo Acb por medio de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de una región específica altamente conservada del gen *rpoB* en varias cepas de *A. baumannii* (Abhari et al., 2021).

2.3 Patogénesis

A. baumannii es conocido por causar una gran variedad de infecciones nosocomiales, tales como infecciones en el tracto urinario, en heridas, en piel y tejidos blandos, bacteremias y neumonías asociadas a ventiladores, siendo estas dos últimas las de mayor impacto debido a la alta mortalidad que conllevan (Wong et al., 2017).

A. baumannii presenta la habilidad de sobrevivir en superficies donde la falta de nutrientes les facilita su persistencia y transmisión en el ambiente hospitalario, sirviendo como reservorios para brotes de larga duración. Algunas pueden permanecer viables hasta 4 meses en este tipo de ambientes, siendo comúnmente encontrados en superficies abióticas y en las manos del personal de la atención a la salud en mayor cantidad conforme a otras especies, como *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* (Almasaudi, 2018).

2.4 Resistencia a antimicrobianos

A. baumannii presenta un alto nivel de resistencia hacia la mayoría de antimicrobianos disponibles, esto debido a la presencia de un gran número de mecanismos de resistencia, tales como la presencia de β -lactamasas, carbapenemasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de eflujo, defectos en la permeabilidad de su membrana debido a una disminución en las porinas y modificaciones de los sitios de acción (C.-R. Lee et al., 2017).

Asimismo, se ha logrado identificar que la presencia de genes de resistencia en *A. baumannii* puede darse de forma constitutiva o de forma adquirida a través de integrones, transposones y plásmidos (Vázquez-López et al., 2020).

2.4.1. Resistencia a aminoglucósidos

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos son la principal forma de resistencia hacia este tipo de antimicrobianos. Este tipo de resistencia se encuentra mediada principalmente por tres clases de enzimas, en las cuales encontramos a las acetiltransferasas, las nucleotidiltransferasas y las fosfotransferasas; estas enzimas modifican la estructura de los aminoglucósidos (M.-F. Lin & Lan, 2014).

En *A. baumannii* se ha reportado la presencia de otro mecanismo de resistencia a este tipo de antimicrobianos, mediado por una metiltransferasa del RNA 16S ribosomal, la cual produce la metilación del sitio de unión del aminoglucósido a la subunidad 16S del RNA ribosomal, llevando a una alta resistencia hacia gentamicina, tobramicina y amikacina (Doi et al., 2015).

2.4.2. Resistencia a beta-lactámicos

La resistencia a este tipo de antimicrobianos esta mediada en gran parte a la producción de β -lactamasas, que son una familia de enzimas que hidrolizan los anillos β -lactámicos, que son estructuras presentes en múltiples antimicrobianos tales como penicilinas, cefalosporinas y el aztreonam (Potron et al., 2015); algunas de estas enzimas son consideradas como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), esto debido a la capacidad que presentan de hidrolizar una gran variedad

de antimicrobianos β -lactámicos. Por otra parte, las carbapenemasas representan otro miembro de la familia de las β -lactamasas con una gran versatilidad, esto debido a la capacidad que presentan de hidrolizar tanto los antimicrobianos carbapenémicos como los β -lactámicos (Marston et al., 2016).

Las β -lactamasas han sido clasificadas por Ambler en base a su estructura molecular y funcional en cuatro clases (A, B, C y D), dependiendo de las secuencias de aminoácidos. Para las clases A, C y D, el sitio activo de la enzima contiene serina y la clase B incluye las metalo- β -lactamasas, las cuales dependen de la unión de un metal en su sitio catalítico para su actividad (Vrancianu et al., 2020).

Como primer grupo, las β -lactamasas de clase A son la causa más frecuente de resistencia a los β -lactámicos. Estas enzimas son inhibidas por el clavulanato y pueden hidrolizar penicilinas y cefalosporinas (Kurihara et al., 2020). Las familias de β -lactamasas de clase A tienen diferentes variantes moleculares con capacidad para hidrolizar cefalosporinas y carbapenémicos. En *A. baumannii*, se ha encontrado la presencia de las familias TEM, GES, CTX-M, SHV, SCO, PER, CARB, VEB y KPC. De estas, la mayoría son β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Vrancianu et al., 2020).

En el segundo grupo, encontramos a las β -lactamasas de clase B o metalo- β -lactamasas (MBL), las cuales presentan zinc u otro metal pesado en el sitio catalítico y tienen la capacidad de hidrolizar casi todos los antibióticos β -lactámicos, excepto los monobactámicos (Vrancianu et al., 2020). La actividad enzimática de estos tipos de β -lactamasas puede inhibirse mediante agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se ha identificado una amplia gama de familias de MBL en *A. baumannii*, tales como imipenemasas (IMP), VIM, SPM, GIM, NDM, SIM, AIM y FIM (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020).

En la tercera agrupación se encuentran las β -lactamasas de clase C, las cuales están codificadas por el gen *ampC* y funcionalmente son cefalosporinas. Estas

β -lactamasas pueden conferir resistencia a las cefamicinas, penicilinas o cefalosporinas (Doi et al., 2015).

En el cuarto grupo se encuentran las β -lactamasas de clase D también llamadas oxacilinasas (OXA), debido a su capacidad para hidrolizar la oxacilina. Se han caracterizado más de 400 enzimas OXA, la mayoría con la capacidad de hidrolizar también carbapenémicos. En *A. baumannii* se ha encontrado la presencia las enzimas OXA-23, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 y OXA-235, identificadas principalmente con un origen cromosomal o en plásmidos (Nguyen & Joshi, 2021).

2.4.3. Resistencia a cefalosporinas

Existen múltiples factores que pueden intervenir en la resistencia a este tipo de antimicrobianos, tales como una permeabilidad disminuida de la membrana, la producción de bombas de eflujo y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, tales como las β -lactamasas (Marston et al., 2016).

La mayoría de los aislamientos de *A. baumannii* que se encuentran en los centros de atención a la salud presentan resistencia a cefalosporinas, incluyendo las de tercera (ceftazidima) y cuarta generación (cefepima), además de que *A. baumannii* produce una β -lactamasa inherente denominada AmpC y también puede producir BLEE, lo cual la lleva a un nivel de resistencia a cefalosporinas clínicamente relevante (Doi et al., 2015).

2.4.4. Resistencia a polimixinas

La resistencia a polimixinas en *A. baumannii* ha sido descrita principalmente por dos mecanismos, siendo el primero la modificación del LPS con la adición de un grupo catiónico como la fosfoetanolamina en el lípido A, esto debido a la activación del sistema de dos componentes PmrA/PmrB, lo que lleva a un aumento de la expresión de *pmrC*, gen cromosomal el cual produce la transferasa que adiciona la fosfoetanolamina en el lípido A (Dortet et al., 2018).

El segundo mecanismo consiste en una inactivación de los tres primeros genes involucrados en la biosíntesis del lípido A, resultando en una pérdida completa del LPS en la bacteria (Moffatt et al., 2010).

2.4.5. Resistencia a carbapenémicos

La resistencia a carbapenémicos producida por *A. baumannii* se ha atribuido principalmente a la producción de carbapenemasas, la cual puede ser de manera intrínseca o adquirida. *A. baumannii* produce una carbapenemasa de tipo OXA-51 de manera inherente, en un bajo nivel, pero transposiciones en las secuencias de inserción pueden producir un fuerte promotor que aumente su producción y por consiguiente un aumento en la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los carbapenémicos.

También se han descrito cinco grupos de carbapenemasas del tipo oxacilinas (OXA) adquiridas por parte de *A. baumannii*, los cuales incluyen las carbapenemasas de los grupos OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143 y OXA-235, siendo el primer grupo el más prevalente producido a nivel mundial (Doi et al., 2015).

Otros estudios han descrito la presencia a nivel hospitalario de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos que presentaron la presencia de genes de la familia blaOXA, además de haber identificado en diversos aislamientos la presencia de uno hasta cuatro genes asociados con la producción de resistencia carbapenémicos (Moghadasi et al., 2018).

Otros mecanismos han sido identificados que forman parte de los mecanismos de resistencia hacia carbapenémicos, tales como la producción de bombas de eflujo, cambios en las porinas presentes en la membrana y mutaciones en los sitios de acción del antimicrobiano (O'Donnell, et al. 2021).

2.5 Clasificación de la multirresistencia a antimicrobianos

Con el surgimiento y aparición de la resistencia antimicrobiana, fue necesaria la aplicación de definiciones que permitieran describir y clasificar bacterias que son resistentes a múltiples agentes antimicrobianos, para poder tener información de la vigilancia epidemiológica que pueda ser confiable y comparada en los diferentes países y entornos de salud. El problema del aumento en la resistencia antimicrobiana es aún más amenazante cuando se considera el limitado número de nuevos agentes antimicrobianos en desarrollo (Santajit & Indrawattana, 2016).

En una iniciativa conjunta realizada por el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) y los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), se aplicaron las definiciones para *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*, debido a su importancia epidemiológica, la resistencia antimicrobiana emergente y la importancia de estas bacterias en los sistemas de salud (Magiorakos et al., 2012).

Las bacterias definidas como multidrogo-resistentes (MDR), son aquellas que son resistentes a tres o más clases de antimicrobianos basado en los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana realizadas *in vitro*. Las bacterias que son clasificadas con resistencia extrema (XDR) tienen una importancia epidemiológica, no solo por su resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, sino también por su potencial a ser resistentes a todo o la mayoría de los agentes antimicrobianos probados. Las bacterias pandrogo-resistentes (PDR) son aquellas que son resistentes a todos los agentes antimicrobianos probados (Magiorakos et al., 2012).

La Tabla 1 muestra los agentes antimicrobianos que han sido establecidos en el género *Acinetobacter* para la definición de su multirresistencia y la Tabla 2 muestra los criterios a seguir para definir su multirresistencia.

Tabla 1. Categorías de antimicrobianos y agentes antimicrobianos usados para definir MDR, XDR y PDR en *Acinetobacter spp* (Magiorakos et al., 2012).

Categoría de antimicrobianos	Agente antimicrobiano
Aminoglucósidos	Gentamicina Tobramicina Amikacina Netilmicina
Carbapenémicos	Imipenem Meropenem Doripenem
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino Levofloxacino
Penicilinas + inhibidores de β-lactamasas	Ticarcilina-ácido clavulánico Piperacilina-tazobactam Ampicilina-sulbactam
Cefalosporinas de espectro extendido	Cefotaxima Ceftriaxona Ceftazidima Cefepima
Inhibidores de la ruta del folato	Trimetoprim-sulfametoxazol
Polimixinas	Colistina Polimixina B
Tetraciclinas	Tetraciclina Doxiciclina Minociclina

Tabla 2. Criterios para la definición de la multirresistencia en *Acinetobacter spp* (Magiorakos et al., 2012).

MDR:	No susceptibles a uno o más agentes en tres o más categorías de antimicrobianos.
XDR:	No susceptibles a uno o más agentes en todas las categorías, excepto dos o menos categorías de antimicrobianos.
PDR:	No susceptibles a todos los agentes antimicrobianos en la lista.

2.6 Factores de virulencia

La biopelícula, la cual se define como una comunidad microbiana compuesta de bacterias unidas irreversiblemente a una superficie, capaces de producir una matriz polimérica extracelular que los mantiene unidos a la superficie. Las biopelículas presentan un rol importante en la progresión de una gran variedad de enfermedades como las infecciones de tracto urinario y respiratorio, queratitis bacteriana, entre otras, presentando mecanismos de persistencia y resistencia que contribuyen a estadios crónicos de las infecciones y como una importante estrategia de supervivencia en el ambiente hospitalario (Melton & Anderson, 2019).

La mayoría de las cepas de *A. baumannii* producen un tipo de pili denominado Csu, crucial en la formación de las biopelículas y el mantenimiento en las superficies abióticas, además de la producción de proteínas asociadas a biopelículas, que influyen en la maduración y formación del mismo (Harding et al., 2018).

Asimismo, las proteínas de membrana pertenecientes a la familia OmpA presentes en *A. baumannii* desarrollan una gran variedad de funciones, tales como la adhesión a las células del hospedero, producción de biopelículas y en la resistencia a antimicrobianos (Almasaudi, 2018).

La relación entre el desarrollo de biopelículas y la resistencia antimicrobiana ha sido analizada en diversos estudios. En un estudio realizado en aislamientos de *A. baumannii* recolectadas de infecciones nosocomiales, se observó que el 73.72% fueron identificadas fenotípicamente como productoras de biopelículas por medio del ensayo en microplaca, además de que el al menos el 92% de estos aislamientos eran multidrogosresistentes (Babapour et al., 2016).

Otro estudio realizado en aislamientos de *A. baumannii* provenientes de infecciones en pacientes que se encontraban en unidades de cuidados intensivos, mostró que el 91% eran extremo drogo-resistentes. Aunado a esto, todos los aislamientos fueron capaces de producir biopelículas, además de ser identificado al menos un gen relacionado con la producción de biopelículas en todos los aislamientos y el 98% contenía más de 4 genes simultáneamente (Zeighami et al., 2019).

La motilidad es la capacidad que presenta un organismo para moverse, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de la superficie, las bacterias pueden permanecer localizadas, desplazarse para colonizar áreas más grandes o invadir el tejido del huésped (Harshey, 2003).

La motilidad de tipo twitching o de arrastre en *A. baumannii* consiste en la capacidad que presenta la bacteria para moverse en superficie semisólidas por medio del uso de pilis (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020).

El pili de tipo IV consiste generalmente en filamentos delgados de 1 a 4 μm de largo compuestos por subunidades de pilina, el cual se extiende y se adhiere a la superficie para después producir la retracción del mismo, llevando la bacteria hacia adelante (Clemmer et al., 2011).

Por otra parte, *A. baumannii* también es capaz de presentar un tipo de motilidad asociada a la superficie, la cual es parecida y también denominada de tipo “swarming”, a pesar de que este desplazamiento es dependiente de la presencia de flagelos y *A. baumannii* no los presenta (Harding et al., 2018).

Un estudio realizado en aislamientos clínicos de *A. baumannii* obtenidos de pacientes hospitalizados, se observó que el 35% de los aislamientos presentaron motilidad además de que el 79% fueron positivos a producción de biopelículas (Aliramezani, et al., 2019).

Además de estos factores, se ha sugerido que algunas cepas de *A. baumannii* pueden causar bacteremias con una alta tasa de mortalidad debido a la capacidad que presentan de resistir la acción del complemento en el suero humano (Magda et al., 2022). Esto se puede deber a la presencia del lipopolisacárido, además que la producción de biopelículas en cepas de *A. baumannii* puede ser un mecanismo por el cual se inhibe la vía del complemento evadiendo la fijación de la proteína C3 del complemento o inhibiendo la convertasa responsable del anclaje de C3 y de la activación de la vía por la unión de C3b (King et al., 2009).

Otros factores de virulencia producidos por *A. baumannii*, tales como CipA, una proteína exterior de membrana y la proteasa PKF, presentan un rol en la degradación de las proteínas del complemento (Magda et al., 2022). Estos mecanismos están centrados en evitar la adherencia de C3b en la superficie bacteriana, lo que disminuye la opsonización de la bacteria e impide la formación del complejo de ataque a membrana, lo cual permite la supervivencia de las mismas (García-Patiño et al., 2017).

En un estudio realizado durante un periodo de 6 años en infecciones causadas por *A. baumannii*, se identificó la presencia de altos niveles de resistencia a la respuesta inmunitaria producida por el suero humano y aunado a esto, la mayoría de los aislamientos presentó la capacidad de producción de biopelícula (Yu, et al., 2021).

2.7 Panorama mundial

Diversos estudios han sido llevados a cabo para la vigilancia epidemiológica y análisis de la propagación de *Acinetobacter* a nivel mundial.

El programa de vigilancia epidemiológica SENTRY, que fue diseñado para dar seguimiento a las tendencias en la resistencia antimicrobiana para los microorganismos de mayor importancia clínica en Norteamérica, Europa, Asia-Pacífico y Latinoamérica, durante el periodo de 1997 a 2016, se observó una disminución en la susceptibilidad a una gran variedad de antimicrobianos en todas las regiones, además de una prevalencia mayor al 55% de cepas XDR en Europa, Latinoamérica y la región Asia-Pacífico (Gales et al., 2019).

En contraste, de acuerdo al reporte realizado por la red europea de vigilancia a la resistencia antimicrobiana durante el periodo de 2013 a 2017, existió una predominancia mayor al 50% en infecciones invasivas provocadas por *Acinetobacter* resistente a carbapenémicos en los países de Europa del este y del sur (Ayobami et al., 2020).

Asimismo, *Acinetobacter* resistente a carbapenémicos forma parte de los 18 microorganismos incluidos en el último reporte nacional realizado por los CDC en Estados Unidos, dentro del cual ha sido clasificado con un nivel de amenaza

urgente, esto debido a las pocas opciones de tratamiento con las que se cuenta y su capacidad de sobrevivir un largo tiempo en las superficies, reportándose 8500 casos de infecciones hospitalarias en 2017, así como 700 muertes estimadas y un costo de atención médica de 281 millones de dólares en el mismo año (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019).

2.8 Panorama en México

Se han realizado diversos estudios en cuanto a la multirresistencia presentada por *A. baumannii* en los últimos años. En estudio realizado en un hospital de tercer nivel de Monterrey se describió la presencia del 74% de aislamientos de *A. baumannii* MDR en un periodo de tres años, además de un aumento en la prevalencia de aislamientos resistentes a meropenem (57% a 63%) (Garza-González et al., 2010).

Otro estudio realizado en un Hospital de Guadalajara durante 13 años observó disminución de la sensibilidad a meropenem del 92% al 12%, además de que diferentes aislamientos producían diferentes tipos de BLEE y metalobetalactamasas tales como VIM-4, IMP-1 y OXA-24 (Morfín-Otero et al., 2013a).

En el informe anual del 2015 de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, el cual recolecta información de una gran cantidad de hospitales de diferentes instituciones en todo el país, reporta a *A. baumannii* como el quinto agente etiológico de IAAS y como el principal microorganismo aislado en los brotes hospitalarios presentados en las IAAS, demostrando esto la gran importancia que se debe de tener en cuanto al control de estas infecciones.

En el Informe publicado en 2020 de la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR) sobre la evolución de la resistencia que han presentado múltiples microorganismos causantes de IAAS, se identificaron altos niveles de resistencia a la mayoría de antimicrobianos por parte del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, manteniéndose estos niveles durante el periodo de 10 años que se realizó la investigación en múltiples hospitales del país (Garza-González et al., 2020).

Este mismo grupo de estudio, logró identificar la presencia de una gran variedad de genes de resistencia contra carbapenemasas en cepas de *A. baumannii* obtenidas de diferentes hospitales de México, en los cuales los más frecuentes fueron el gen *bla_{OXA-24}* y *bla_{OXA-23}*, además de otros genes tales como *bla_{VIM}* y *bla_{NDM}* (Garza-González et al., 2021).

3 Objetivos

3.1 General

Realizar la caracterización fenotípica y molecular de aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* de origen hospitalario.

3.2 Específicos

- Efectuar la caracterización fenotípica de la resistencia antimicrobiana presente en aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.
- Identificar la prevalencia de genes de resistencia a carbapenémicos en aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.
- Caracterizar los fenotipos de virulencia de formación de biopelícula, tipo de motilidad y resistencia al efecto bactericida del suero humano en aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.
- Diferenciar por métodos moleculares a nivel de especie los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.

3.3 Profesionalizantes

- Desarrollar conocimientos y capacidades en técnicas microbiológicas y de detección molecular.
- Adquirir habilidades de comunicación oral y escrita para la difusión de conocimientos sobre el área de la salud.
- Profundizar en la importancia del profesional de la salud para la investigación de las enfermedades infecciosas.

4 Metodología

4.1. Diseño experimental

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo transversal descriptivo.

4.1.1. Definición del Universo

Aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* obtenidos en varios hospitales del estado de Querétaro en el periodo de noviembre 2018 - diciembre 2019, incluyendo el 100% de las muestras sin importar el servicio médico del que provengan.

4.1.2. Tamaño de muestra

Todos los aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* identificados en el laboratorio de análisis clínicos de los hospitales participantes durante el periodo de estudio.

4.1.3. Criterios de inclusión

Todos los aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* obtenidos en los diferentes servicios e identificados por el propio laboratorio de análisis clínicos de los hospitales participantes.

4.1.4. Criterios de exclusión

Todos los aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* que hayan sido aislados en conjunto con otro microorganismo.

4.1.5. Criterios de eliminación

Todos aquellos aislamientos los cuales no sean recuperables o que se encuentren contaminados al momento de su resiembra del medio de conservación.

4.1.6. Definición de las variables y unidades de medida

De acuerdo con la tabla 3, se mencionan tanto la definición, las unidades de medida y el tipo de variable utilizadas para este estudio.

Tabla 3. Definición de las variables y unidades de medida

Variable	Definición	Unidad de medida	Tipo de variable
Resistencia antimicrobiana	Capacidad de un microorganismo de impedir que un antimicrobiano actúe en contra de él.	Diámetro del halo de la zona de inhibición (mm).	Cualitativa Nominal
Clasificación de la multirresistencia antimicrobiana	Categorización de un microorganismo de acuerdo al número de categorías de antimicrobianos a los que es resistente.	MDR, XDR y PDR.	Cualitativa Nominal
Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos	Amplificación de diversos genes asociados a carbapenemasas	Presencia del gen Ausencia del gen	Cualitativa Dicotómica
Fenotipo de virulencia de formación de biopelícula	Estructura bacteriana altamente organizada cubierta por una matriz exopolimérica adherida a una superficie sólida.	No formador Débil formador Moderado formador Fuerte formador	Cualitativa Nominal
Fenotipo de virulencia de tipo de motilidad	Habilidad que presentan las bacterias para moverse espontánea e independientemente.	Motilidad tipo "Swarming" Motilidad tipo "Twitching"	Cualitativa Nominal
Fenotipo de virulencia de resistencia al efecto bactericida del suero humano	Habilidad que presentan las bacterias a resistir el efecto que presenta el Complemento sobre ellas.	Resistente Sensible	Cualitativa Dicotómica
Diferenciación molecular de <i>A. baumannii</i>	Amplificación de región parcial del gen <i>rpoB</i> presente sólo en <i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> No <i>Acinetobacter baumannii</i>	Cualitativa Dicotómica

4.2. Procedimientos

4.2.1. Conservación y resiembra de los aislamientos clínicos

Se contó con 73 aislamientos clínicos identificados como complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Querétaro, obtenidos a través del proyecto con número de registro FME-2018-09.

Después de aplicar los criterios de inclusión, exclusión y eliminación, se trabajó con 54 de los 73 aislamientos pertenecientes al cepario. Los aislamientos se encontraban conservados en criotubos con caldo BHI adicionado con 15% de glicerol y almacenados a -35° C, a partir de los cuales se realizó una resiembra en tubos con caldo BHI por 24 horas a 37°C y después se resembraron los aislamientos en placas de agar Luria-Bertani (LB) por 24 horas a 37 °C para su óptimo crecimiento, tomando el inóculo con un asa de platino y llevando a cabo una siembra por agotamiento de estría en la placa.

4.2.2. Identificación del perfil ampliado de resistencia

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad según las definiciones de MDR con fines epidemiológicos sugeridas por CDC y ECDC para *Acinetobacter spp.* (Magiorakos et al., 2012), mediante las técnicas de Kirby-Bauer y de microdilución (Hudzicki, 2009; Wiegand et al., 2008). Se evaluaron solo aquellos antimicrobianos que no fueron analizados por el laboratorio del Hospital General de San Juan del Río y del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer (Tabla 4; página 27).

4.2.3. Clasificación del grado de multirresistencia

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad realizadas previamente y la complementación de los datos obtenidos de las pruebas de susceptibilidad realizadas por el hospital para cada aislamiento, se categorizó a cada aislamiento como multidrogo-resistente (MDR), de resistencia extrema (XDR)

o pandrogro-resistente (PDR), de acuerdo con los lineamientos establecidos por el ECDC y los CDC.

Tabla 4. Categorías de antimicrobianos evaluadas para *Acinetobacter sp.*

Categoría de antimicrobianos	Agente antimicrobiano
Aminoglucósidos (AG)	Gentamicina (GTM)
	Tobramicina (TOB)
	Amikacina (AMK)
	Netilmicina (NET)
Carbapenémicos (CP)	Imipenem (IMP)
	Meropenem (MRP)
	Doripenem (DOR)
Cefalosporinas de espectro extendido (CSEE)	Cefotaxima (CTX)
	Ceftriaxona (CFX)
	Ceftazidima (CFZ)
	Cefepima (CFP)
Fluoroquinolonas (FQ)	Ciprofloxacino (CFL)
	Levofloxacino (LFL)
Penicilinas + inhibidores de β-lactamasas (P + IBL)	Ticarcilina-ácido clavulánico (T-A)
	Piperacilina-tazobactam (P-T)
Inhibidores de la ruta del folato (IRF)	Trimetoprim-sulfametoxazol (T-S)
Penicilinas + inhibidores de β-lactamasas (P + IBL2)	Ampicilina-sulbactam (A-S)
Polimixinas (PM)	Colistina (COL)
	Polimixina B (PXB)
Tetraciclinas (TC)	Tetraciclina (TET)
	Doxiciclina (DOX)
	Minociclina (MIN)
	Antimicrobianos evaluados por los hospitales
	Antimicrobianos a evaluar

Se identificó como MDR a aquellos aislamientos que no fueron susceptibles a uno o más agentes en tres o más categorías de antimicrobianos, como XDR aquellos que no fueron susceptibles a uno o más agentes en todas, excepto dos o menos categorías de antimicrobianos y como PDR a aquellos que no fueron susceptibles a todos los agentes antimicrobianos en la lista.

4.2.4. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de las resiembras de los aislamientos en agar BHI usando un kit de extracción de la marca Invitrogen® el cual utiliza un método selectivo de separación por medio de una matriz sólida embebida dentro de una columna, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante para la extracción de ADN en bacterias Gram negativas, el cual se encuentra descrito en el Anexo 9.1. Una vez obtenidos los templados de ADN de cada uno de los aislamientos, se mantuvieron a -20 °C para su posterior análisis.

4.2.5. Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos

Se identificó la presencia de genes productores de carbapenemasas por medio de PCR (Ellington et al., 2007). Se trabajó con el templado de ADN obtenido previamente para la identificación molecular. El ensayo de PCR para la amplificación de los oligonucleótidos descritos en la Tabla 5 consistió en una fase inicial de desnaturalización a 94 °C por dos minutos, seguido de 35 ciclos de temperatura constados por 94 °C por un minuto, “X” °C por 30 segundos (donde “X” corresponde a cada una de las Tm para cada gen descritas en la Tabla 5) y 72 °C por 30 segundos, y una fase de elongación final a 72 °C por un minuto. En la Figura 1 se muestra una representación gráfica del programa de amplificación utilizado para la identificación de genes de resistencia a carbapenémicos.

Los productos de PCR amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó un gel con una concentración al 1.0% en buffer TAE (Tris/Acetato/EDTA) 1X, al cual se le añadió 2 µL de buffer de carga y 5 µL del producto de amplificación en cada pocillo, se colocó en la cámara y programó la

electroforesis a 80 volts por 45 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se observó el gel en un transiluminador de UV.

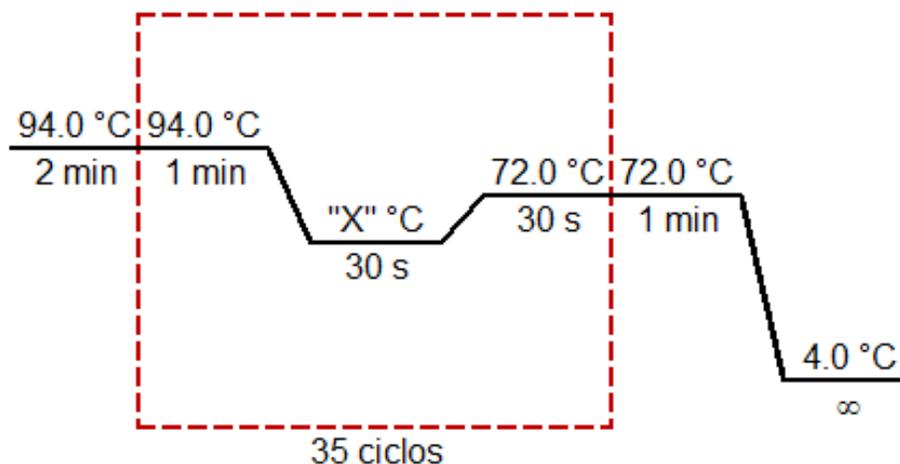


Figura 1. Descripción gráfica del programa de amplificación a seguir para la identificación de genes de resistencia a carbapenémicos.

Tabla 5. Oligonucleótidos por utilizar en este estudio.

Gen	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del fragmento (pares de bases)	Tm	Referencia
<i>bla_{OXA-23-like}</i>	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	501 pb	53 °C	(Turton, Ward, et al., 2006)
<i>bla_{OXA-24-like}</i>	F: ATGAAAAAATTTATACTTCC R: TTAAATGATTCCAAGATTTTC	825 pb	50 °C	(Turton, Ward, et al., 2006)
<i>bla_{OXA-58-like}</i>	F: CGATCAGAATGTTCAAGCGC R: ACGATTCTCCCCTCTGCGC	328 pb	53 °C	(Pournaras et al., 2006)
<i>bla_{VIM}</i>	F: AGTGGTGAGTATCCGACAG R: ATGAAAGTGCGTGGAGAC	361 pb	59 °C	(Ellington et al., 2007)
<i>bla_{IMP}</i>	F: CTACCGCAGCAGAGTCTTTG R: AACCAGTTTTGCCTTACCAT	587 pb	57 °C	(Ellington et al., 2007)
<i>bla_{SIM}</i>	F: TACAAGGGATTTCGGCATCG R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570 pb	59 °C	(Ellington et al., 2007)
<i>bla_{NDM}</i>	F: GGTGCATGCCCGGTGAAAT R: ATGCTGGCCTTGGGGAAC	661 pb	60 °C	(Ellington et al., 2007)
<i>bla_{KPC}</i>	F: CTGTCTTGTCTCTCATGGCC R: CTCGCTGTGCTTGCATCC	770 pb	63 °C	(Ellington et al., 2007)
<i>bla_{GES}</i>	F: CTTCAATCACGCACTATTAC R: TAACTTGACCGACAGAGG	827 pb	55 °C	(Ellington et al., 2007)

4.2.6. Determinación de la capacidad de formación de biopelícula

Se analizó la capacidad de los aislados para formar biopelícula in vitro utilizando una modificación de la metodología descrita por varios autores (Babapour et al., 2016; O'Toole, 2011; Shukla & Rao, 2017; Vijayakumar et al., 2019).

Se sembraron los aislamientos en medio LB durante 24 h a 37°C en un ambiente aeróbico. A continuación, se prepararon suspensiones bacterianas en caldo LB hasta una densidad óptica del 0.5 en la escala de McFarland, se dispensaron alícuotas de 50 µL en tres pocillos adyacentes sobre una placa de microtitulación (siembra por triplicado) y se agregaron 150 µL de caldo MH a cada uno de ellos. Como control negativo se añadieron 200 µL de caldo MH estéril en cada pocillo adyacente del lado derecho de la siembra por triplicado para cada prueba. Se incubó la microplaca cerrada durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación el contenido de cada microplaca se removió por inversión, realizando además tres lavados consecutivos con 250 µL de buffer de fosfatos y se colocaron invertidas a secar en la estufa por 30 minutos. Se adicionará a cada pocillo 200 µL de una solución de cristal violeta al 0.1% dejando actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente, se desechó el exceso de colorante por inversión, se realizaron nuevamente los tres lavados con 250 µL de buffer de fosfatos y se secó la placa en la estufa durante 30 minutos. El colorante unido a la biopelícula de los pocillos se resolubilizó con 200 µL de una solución de etanol-acetona (80:20 v/v). Por último, se leyó la densidad óptica (DO) a 580 nm usando un lector de ELISA.

El promedio de las tres lecturas de la DO registrada se tomó como referencia para clasificar los aislamientos como no formador de biopelícula y formador de biopelícula (débil, moderado o fuerte). Para esto, se definió el límite de la DO (DOL), el cual se estableció como tres veces el valor de la desviación estándar por encima de la media del control negativo. De esta manera, las cepas se clasificaron como se indica en el Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación según la formación de biopelícula.

Valor de DO	Clasificación
$DO \leq DOL$	No formador de biopelícula
$DOL < DO \leq 2DOL$	Formador débil de biopelícula
$2DOL < DO \leq 4DOL$	Formador moderado de biopelícula
$4DOL < DO$	Formador fuerte de biopelícula

4.2.7. Determinación del tipo de motilidad

Para la determinación del tipo de motilidad que presentan los diferentes aislamientos *in vitro* se realizó una modificación de la metodología descrita por varios autores (Clemmer et al., 2011b; Eijkelkamp et al., 2011; Turnbull & Whitchurch, 2014).

Para la motilidad del tipo “Swarming”, se sembraron los aislamientos en medio LB durante 16 a 20 h a 37°C en un ambiente aeróbico. Después del periodo de incubación se preparó una suspensión bacteriana a una densidad óptica de 0.5 en la escala de MacFarland con solución salina estéril. Se tomaron 2 μ L de la suspensión bacteriana y se colocaron de forma perpendicular en el centro de la superficie de una placa LB Swarming (Anexo 9.2), evitando que la muestra se mueva de la posición colocada. Se dejó secar el inóculo colocado durante 15 minutos dentro de una campana de flujo. Una vez transcurrido el tiempo, se taparon las placas y se colocaron de manera invertida, apiladas en una cantidad no mayor a 3 placas a 37 °C por 48 h. 27

Los aislamientos swarming positivos fueron definidos como aquellos aislamientos que muestren una zona de crecimiento mayor a 10 mm alrededor del sitio de inoculación.

Para la determinación de la motilidad del tipo “Twitching” se sembraron los aislamientos en medio LB durante 16 a 20 h a 37°C en un ambiente aeróbico. Después del periodo de incubación, se homogeneizó el borde exterior del aislamiento sembrado en una zona de la placa sin sembrar y se tomó con un

aplicador de madera una cantidad del inóculo suficiente para cubrir la punta del palillo, cuidando tomar la misma cantidad de inóculo para cada aislamiento.

Se realizó una punción perpendicular en el centro de una placa LB Twitching (Anexo 9.3), penetrando hasta la interfase entre el agar y en el fondo de la placa, moviendo el palillo hacia arriba y hacia abajo varias veces para asegurar que el inóculo ha llegado al fondo de la placa y cuidando no mover el palillo hacia los lados. Se colocaron las placas invertidas y apiladas en una cantidad no mayor a 3 placas a 37 °C por 48 h. Por último, se removió el agar cada placa y se agregó a cada caja de poliestireno una cantidad suficiente de solución TM (Anexo 9.4) dejándose actuar durante 15 minutos.

Se clasificaron como “twitching positivos” aquellos aislamientos que presenten un halo mayor a 5 mm en la interfase entre el agar y el fondo de la placa.

4.2.8. Determinación de la actividad bactericida del suero

Para determinar la actividad bactericida del suero, se realizará la metodología descrita previamente por varios autores (Kim et al., 2009; King et al., 2009; Wiegand et al., 2008).

Se trabajó con una microplaca de 96 pocillos en la cual se colocarán 100 µL de caldo MH, desde el pocillo 1 hasta el pozo 12. Después, se colocaron 100 µL de un pool de suero humano (PSH) en el pocillo 1 mezclando varias veces, se transfirieron 100 µL del pocillo 1 hacia el pocillo 2 y así sucesivamente hasta el pocillo 10, en donde los últimos 100 µL se desechan, esto nos permitió obtener diluciones seriadas del suero humano desde 1/1 hasta 1/512. En el pocillo 11 se agregaron 100 µL de un pool de suero humano inactivado por calor (PSH-IC, 56°C por 1h para la inactivación del complemento) como control positivo de crecimiento y el pocillo 12 solamente contendrá 100 µL de caldo MH. Se agregaron 50 µL del inóculo final del pocillo 1 al 11 por medio de una pipeta automática; el pocillo 12 al no tener inóculo, se tomará como control negativo. En la Figura 2, se indica de forma gráfica la preparación de cada serie de pocillos para esta prueba.

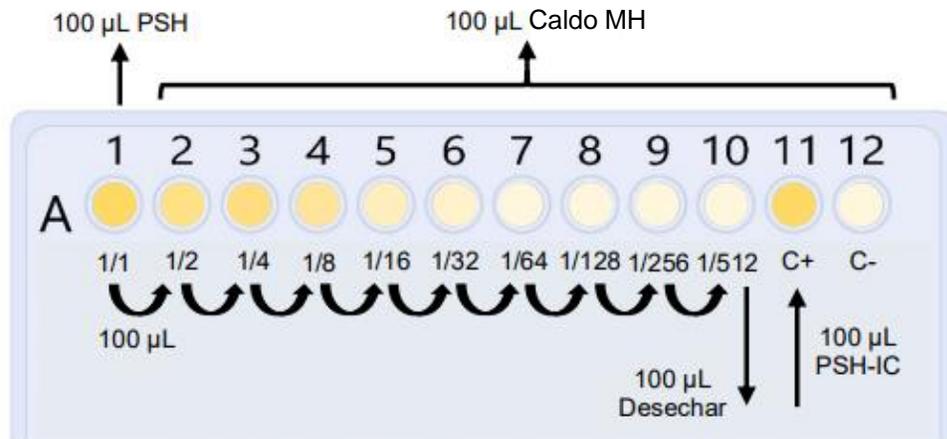


Figura 2. Preparación de la microplaca para la prueba del efecto bactericida del suero para cada aislamiento.

Seguido de la dispensación del inóculo en los pocillos, se colocó la cubierta de la microplaca y se incubaron apiladas en grupos no superiores a 4 microplacas, a 35 ± 2 °C en atmósfera aeróbica. Las microplacas se incubaron de 20-24 horas.

Una vez transcurrido el tiempo, se realizó la lectura de las microplacas en un lector de ELISA a 600 nm para identificar la diferencia de absorbancia contra el promedio de las lecturas del control negativo + 2 desviaciones estándar, siendo aquellos pocillos que presentaron valores de absorbancia mayores, negativos para la inhibición por parte del PSH.

4.2.9. Diferenciación molecular de *A. baumannii* por PCR de los genes *bla_{OXA-51-like}* y *rpoB*.

Para diferenciar a nivel molecular los aislamientos de *A. baumannii* dentro del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, se utilizó una modificación de una metodología descrita previamente (Abhari et al., 2021).

Se trabajó con los templados de ADN obtenidos previamente de la extracción para las pruebas de identificación de genes de resistencia a carbapenémicos. El ensayo de PCR para la amplificación de la secuencia específica de los genes *bla_{oxa-51-like}* y *rpoB* descritos en la Tabla 7 consistió en una fase inicial de desnaturalización a 94

°C por dos minutos, seguido de 35 ciclos de temperatura constados por 94 °C por un minuto, 55 °C por un minuto, 72 °C por 30 segundos, y una fase de elongación final a 72 °C por un minuto. En la Figura 3 se muestra una representación gráfica del programa de amplificación utilizado para la diferenciación molecular de *A. baumannii* del resto del complejo ACB. Los productos de PCR amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó un gel con una concentración al 1.0% en buffer TAE (TrisAcetato/EDTA) 1X, al cual se le añadieron 2 µL de buffer de carga y 5 µL del producto de amplificación en cada pocillo, se colocó en la cámara y programó la electroforesis a 80 volts por 45 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se observó el gel en un transiluminador de UV.

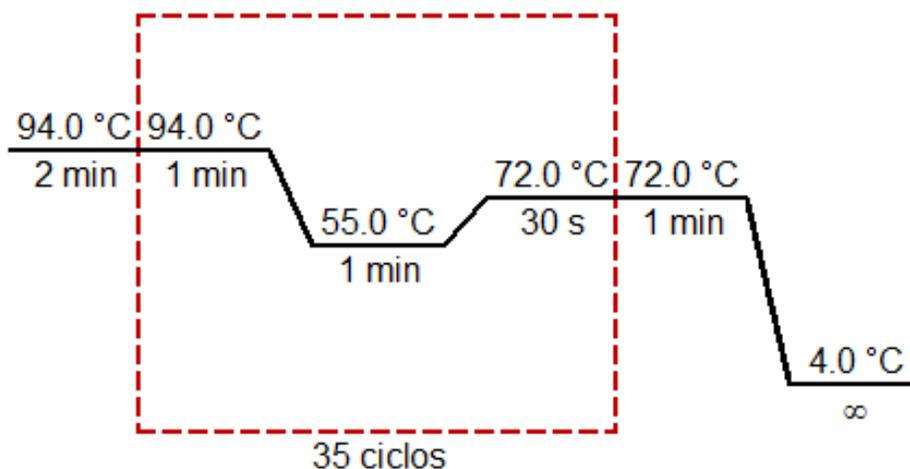


Figura 3. Descripción gráfica del programa de amplificación utilizado para la diferenciación molecular de *A. baumannii* del resto del complejo ACB.

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos usados para la identificación de los genes *bla_{oxa-51-like}* y *rpoB*.

Gen	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del fragmento (pares de bases)	Referencia
<i>rpoB</i>	F: CTGACTTGACGCGTGA R: TGTTTGAACCCATGAGC	1024 pb	(Abhari et al., 2021)
<i>bla_{oxa-51-like}</i>	F: TGAACATTAAAGCACTCTT R: CTATAAAATACCTAATTGTT	825 pb	(Pournaras et al., 2006)

4.3. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Se trabajó con estadística descriptiva y análisis de la prevalencia presente para los niveles de resistencia a los diferentes antimicrobianos, los diferentes factores de virulencia probados y los genes de resistencia a carbapenémicos probados en este estudio por medio de la siguiente fórmula:

$$Prevalencia = \frac{N_{presente}}{N_{total}} \times 100$$

Donde:

N_{presente}: Número de casos presentes

N_{total}: Número total de casos

5 Resultados

Se trabajó con 54 aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* de origen hospitalario. En la Figura 4 se muestra la distribución presentada en cada hospital participante.

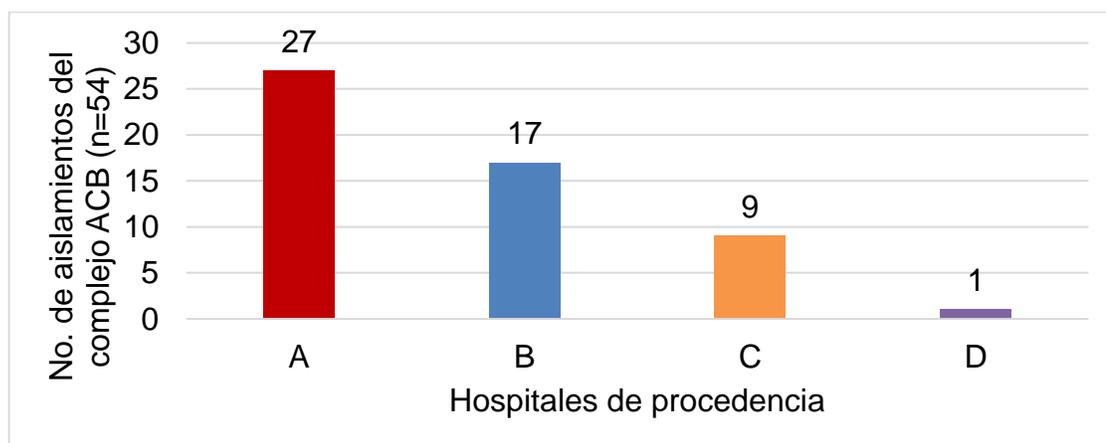


Figura 4. Distribución de los aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* en los hospitales participantes.

Los aislamientos fueron obtenidos de diferentes servicios hospitalarios, siendo los más frecuentes para del complejo ACB, Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), medicina interna (MI) y cirugía. En la Tabla 8 se muestra la cantidad de aislamientos provenientes de cada servicio.

Tabla 8. Distribución de aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* obtenidos en los servicios hospitalarios.

Servicio	No. de aislamientos	%
UCI	21	38.9
MI	10	18.5
Cirugía	7	13.0
Pediatría	1	1.9
Otros	12	22.2
G y O	1	1.9
IAAS	1	1.9
CPE	1	1.9
Total	54	100

Abreviaturas: UCI: Unidad de cuidados intensivos, MI: Medicina Interna, G y O: Ginecología y obstetricia, IAAS: Infecciones asociadas a la atención de la Salud, CPE: Cúter Patológico Externo. La categoría Otros, engloba a los aislamientos para los cuales no se contaba con información clara del servicio de procedencia, pero por su importancia clínica, fueron incluidos en el análisis.

La distribución de los aislamientos según el tipo de muestra del cual se obtuvieron se observa en la Tabla 9, siendo para el complejo ACB el más frecuente la secreción bronquial con un 53.7% (n=29), seguido de sangre con un 25.9% (n=14). Los demás aislamientos fueron obtenidos de tipos de muestras menos frecuentes, como puntas de catéter, orina, entre otros. Para los aislamientos indicados como provenientes de secreciones, no fue especificado el tipo de secreción al que correspondían.

Tabla 9. Distribución de aislamientos del complejo ACB según el tipo de muestra biológica del cual fue obtenido.

Tipo de muestra	No. de aislamientos	%
Secreción bronquial	29	53.7
Sangre	16	29.6
Punta de catéter	4	7.4
Secreción	3	5.6
Orina	1	1.9
Otros	1	1.9
Total	54	100

5.1. Identificación del perfil ampliado de susceptibilidad

Se evaluó la susceptibilidad de los 54 aislamientos del complejo ACB a 10 antimicrobianos del perfil ampliado de resistencia propuesto por los CDC, determinado a través de las pruebas realizadas por el método de Kirby-Bauer para netilmicina (NET), tobramicina (TOB), ticarcilina-ácido clavulánico (TIM), cefotaxima (CTX), tetraciclina (TET), doxiciclina (DOX) y minociclina (MIN), por el método semicuantitativo de Epsilon-test para doripenem (DOR) y por el método de microdilución para colistina (COL).

Para polimixina B (PXB*), los valores obtenidos sobre la susceptibilidad a COL para cada aislamiento de ambos microorganismos predicen los valores de susceptibilidad para este antimicrobiano, según lo indicado por el CLSI en el documento M100 ed. 32. (CLSI, 2022). En la Tabla 10 se muestran la frecuencia de los aislamientos susceptibles, intermedios y resistentes a cada antimicrobiano analizado.

Tabla 10. Frecuencia de aislamientos del complejo ACB susceptibles, intermedios y resistentes a los antimicrobianos analizados.

Antimicrobianos analizados	Susceptibles		Intermedios		Resistentes	
	No. de aislamientos	%	No. de aislamientos	%	No. de aislamientos	%
NET	6	11.1	12	22.2	36	66.7
TOB	4	7.4	0	0.0	50	92.6
TIM	3	5.6	1	1.9	50	92.6
DOR	6	11.1	4	7.4	44	81.5
CTX	0	0.0	4	7.4	50	92.6
TET	26	48.1	5	9.3	23	42.6
DOX	39	72.2	1	1.9	14	25.9
MIN	38	70.4	5	9.3	11	20.4
COL	27	50.0	0	0.0	27	50.0
PXB*	27	50.0	0	0.0	27	50.0

Los resultados del perfil ampliado de susceptibilidad, en conjunto con los resultados de susceptibilidad proporcionados por los laboratorios clínicos de los hospitales participantes se analizaron en conjunto, para determinar la susceptibilidad a las 9 categorías de antimicrobianos propuestos por los CDC (Magiorakos et al., 2012) (cita). Como ya se mencionó en la metodología y según lo indicado por estos autores, para este análisis se consideran no susceptibles tanto los aislamientos resistentes como los que entran en la categoría de resistencia intermedia. En la Figura 5 se muestra el porcentaje aislamientos no susceptibles a uno o más agentes antimicrobianos, dentro de cada categoría antimicrobiana analizada. En el Anexo 9.5 se muestra la Figura 13 que desglosa la no susceptibilidad a cada uno de los 22 antimicrobianos considerados para este análisis.

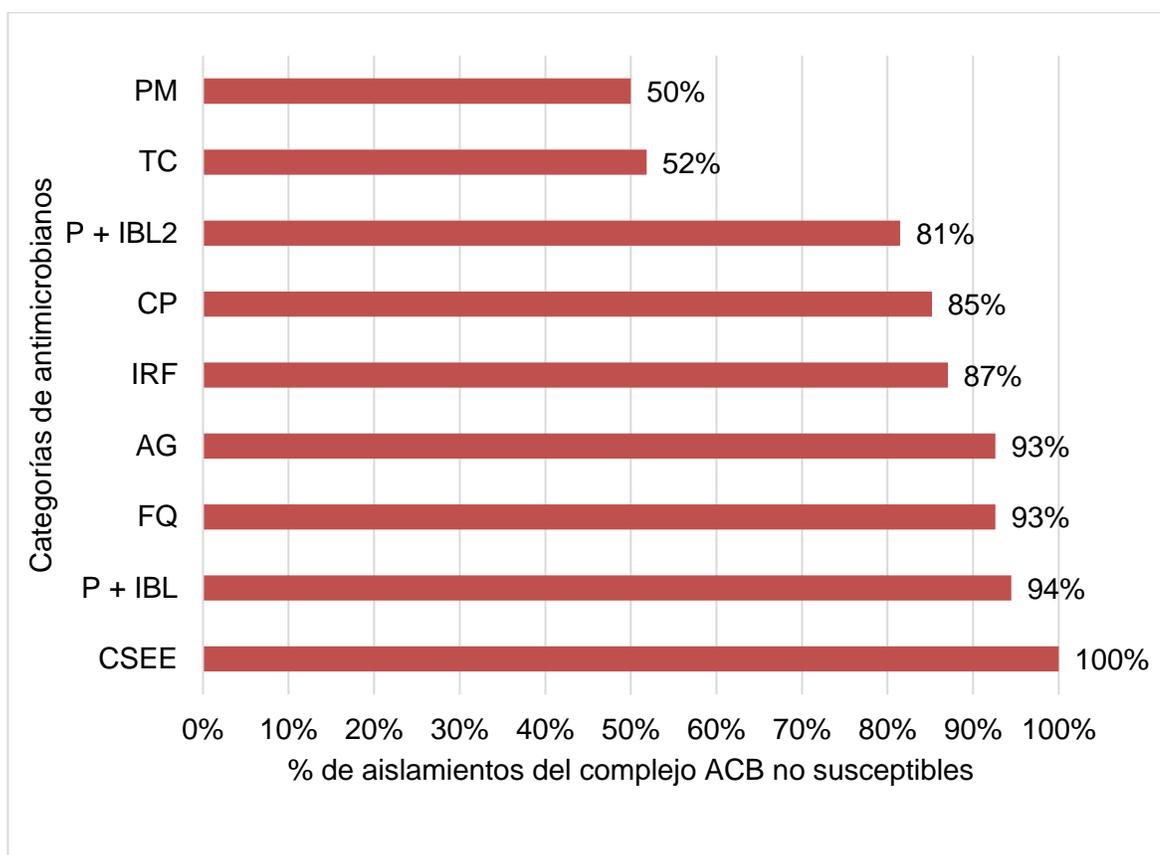


Figura 5. Porcentaje de aislamientos del complejo ACB no susceptibles a las diferentes categorías de antimicrobianos probadas. **Nota: Ver abreviaturas en la Tabla 4.**

5.2. Clasificación del grado de multirresistencia

Se realizó la clasificación de la multirresistencia de los 54 aislamientos del complejo ACB, de acuerdo con las definiciones establecidas por el ECDC y los CDC. Se clasificaron como no multidrogo-resistentes (NO MDR) al 5.6% (3/54), el 9.3% (5/35) fueron multidrogo-resistentes (MDR), el 83.3% (45/54) se clasificaron con resistencia extrema (XDR) y el 1.9% (1/54) como pandrogo-resistentes, como se puede observar en la Figura 6. Los aislamientos MDR mostraron variación en cuanto al número de categorías a las que no fueron susceptibles, las cuales fueron desde 3 hasta 6 categorías. Los aislamientos XDR fueron no susceptibles a uno o más antimicrobianos dentro de 7 hasta todas las categorías de antimicrobianos. El

único aislamiento PDR no fue susceptible a los 22 antimicrobianos listados dentro de las definiciones.

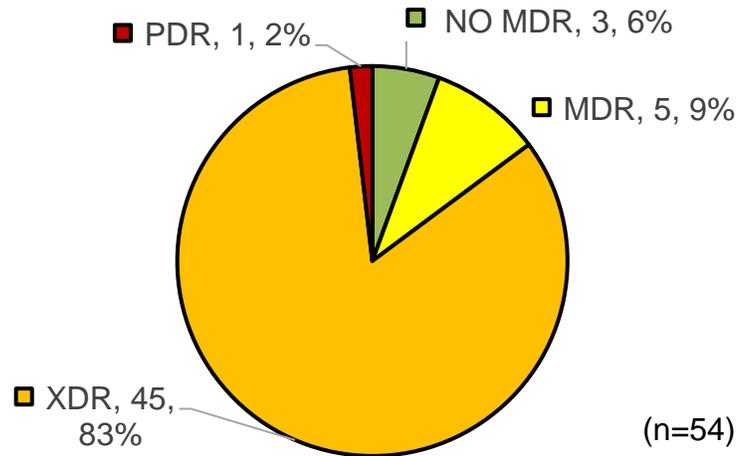


Figura 6. Clasificación de la multiresistencia de aislamientos del complejo ACB.

En cuanto a la distribución de la multiresistencia de los aislamientos del complejo ACB dentro de los servicios de procedencia, caber resaltar que la UCI fue el servicio que presentó 4 de los 5 aislamientos clasificados como MDR y el aislamiento PDR. Por otra parte, 3 de los 5 aislamientos MDR fueron aislados a partir de sangre, siendo los otros 2 aislamientos y el aislamiento PDR obtenidos de secreción bronquial.

Con base en las categorías de antimicrobianos específicos a los que los aislamientos fueron no susceptibles, estos fueron categorizados en los patrones que se muestran en la tabla 11. Se presentaron 3 patrones de resistencia dominantes en el 66.6% (34/54) de los aislamientos del complejo ACB; en primer lugar, el patrón identificado como “G1” con un 25.9% (14/54), en segundo lugar, el patrón “H” con un 22.2% (12/54) y por último el patrón “E1” con un 18.5% (10/54).

Tabla 11. Patrones de resistencia observados en los aislamientos del complejo ACB.

No. de categorías	Patrón	AG	CP	CSEE	FQ	P + IBL	IRF	P + IBL2	PX	TC	No. de aislamientos	%
1	A	S	S	NS	S	S	S	S	S	S	1	1.9%
2	B1	S	S	NS	S	S	S	S	NS	S	1	1.9%
2	B2	S	S	NS	S	NS	S	S	S	S	1	1.9%
3	C	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	S	1	1.9%
5	D	NS	S	NS	NS	NS	S	S	S	NS	1	1.9%
6	E1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	S	1	1.9%
6	E2	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	S	NS	1	1.9%
6	E3	NS	S	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	1	1.9%
7	F1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	7	13.0%
7	F2	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	S	NS	1	1.9%
7	F3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	1	1.9%
8	G1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	14	25.9%
8	G2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	10	18.5%
8	G3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	1	1.9%
9	H	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	11	20.4%
9	H1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	1.9%
TOTAL											54	100%

Tonalidad de color	Clasificación de la multirresistencia
	No MDR
	MDR
	XDR
	PDR

5.3. Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos

Se realizó la búsqueda de los 9 genes de resistencia a carbapenémicos descritos en la metodología. Sin embargo, no se tuvo éxito alguno para la amplificación con los cebadores diseñados para bacterias Gram negativa en general, por lo que se optó por otro plan basado en la información limitada en México sobre la identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter* (Castillo

Bejarano et al., 2023; Garza-González et al., 2021; Mancilla-Rojano et al., 2020), se procedió a realizar la identificación de genes productores de betalactamasas en 3 aislamientos que fueron secuenciados dentro del laboratorio.

En los resultados obtenidos de la secuenciación se logró identificar la presencia de genes productores de betalactamasas de las clases A, C y D, los cuales se muestran en la tabla 12:

Tabla 12. Genes productores de betalactamasas identificados.

Gen	Clase	Tamaño (pb)
<i>bla_{TEM}</i>	A	861
<i>bla_{ADC-25}</i>	C	1152
<i>bla_{OXA-51-like}</i>	D	825
<i>bla_{OXA-24-like}</i>	D	828

A partir de la información obtenida sobre los genes identificados a nivel local por secuenciación, se procedió al diseño de cebadores específicos para los genes productores de carbapenemasas (*TEM*, *OXA-51-like*, *OXA-24-like*). En la tabla 13 se muestra la secuencia y tamaño de cada cebador diseñado para cada uno de los genes de interés. En el anexo 9.6 se puede observar la secuencia completa de cada gen, así como la ubicación de los cebadores y del amplicón dentro del mismo. En la Figura 7 se muestran imágenes representativas de las pruebas moleculares realizadas para la identificación de los genes mencionados anteriormente.

Tabla 13. Diseño de cebadores para la amplificación de genes productores de carbapenemasas.

Gen	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)
<i>bla_{TEM}</i>	F: CGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGC R: TTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGC	392
<i>bla_{OXA-51-like}</i>	F: CGCTATTTTTATTTT CAGCCTGC R: TCTATGAATAGCATGGATTGC	588
<i>bla_{OXA-24-like}</i>	F: CTATTCTAGTTTCTCTCAGTGC R: TTTCTAAGTTGAGCGAAAAGGGG	720

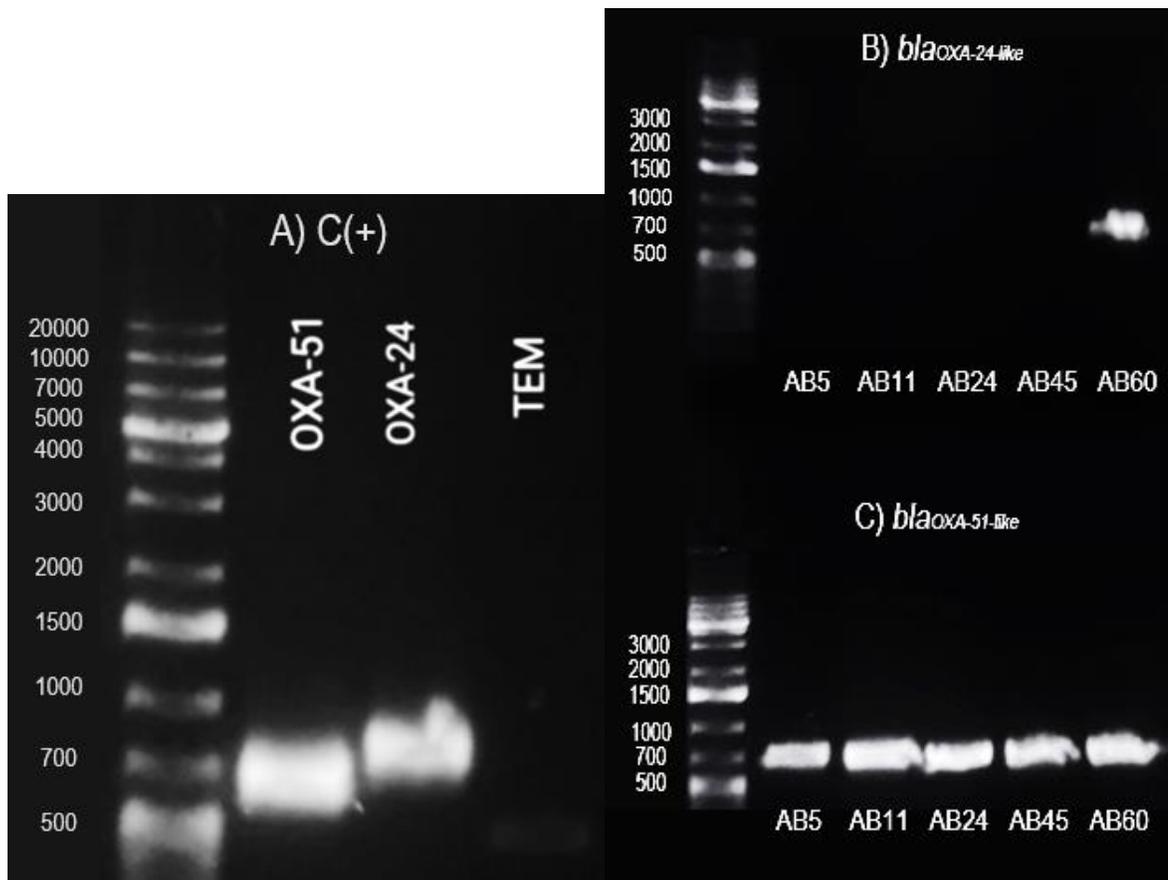


Figura 7. A) Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en aislamiento de referencia. B y C) Identificación de los genes *OXA-24-like* y *OXA-51-like* en muestras representativas. Se puede observar la presencia de *OXA-24-like* en 1 de los 5 aislamientos (B) y de *OXA-51-like* en todos los aislamientos (C).

A continuación, se identificó la prevalencia de los genes de resistencia a carbapenémicos por medio de PCR de punto final, obteniéndose que el 100% de los aislamientos presento el gen *bla_{OXA-51-like}*, el 46.3% para el gen *bla_{OXA-24-like}* (25 de 54 aislamientos) y el 3.7% para el gen *bla_{TEM}* (2 de 54 aislamientos), tal como se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Prevalencia de genes productores de carbapenemasas en aislamientos del complejo ACB.

Gen	% de aislamientos del complejo ACB
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	100% (54/54)
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	46.3% (25/54)
<i>bla</i> _{TEM}	3.7% (2/54)

5.4. Determinación de la capacidad de formación de biopelícula

A los 54 aislamientos del complejo ACB se les determinó la capacidad de formación de biopelícula en base a una modificación de Vijayakumar et al., 2019, determinado por densidad óptica. En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos, encontrándose que predominaron los aislamientos clasificados como moderado y fuerte formador de biopelícula.

Tabla 15. Distribución de la formación de biopelícula en aislamientos del complejo ACB.

Formación de biopelícula	No. de aislamientos	%
No formador	6	11.1
Débil formador	13	24.1
Moderado formador	18	33.3
Fuerte Formador	17	31.5
Total	54	100

5.5. Determinación del tipo de motilidad.

A los 54 aislamientos del complejo ACB, se les determinó la presencia de motilidad tipo swarming y twitching en base a las metodologías descritas previamente. En la Figura 7, se muestran imágenes representativas de la determinación del tipo de

motilidad por algunos de los aislamientos del complejo ACB y en la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de motilidad.

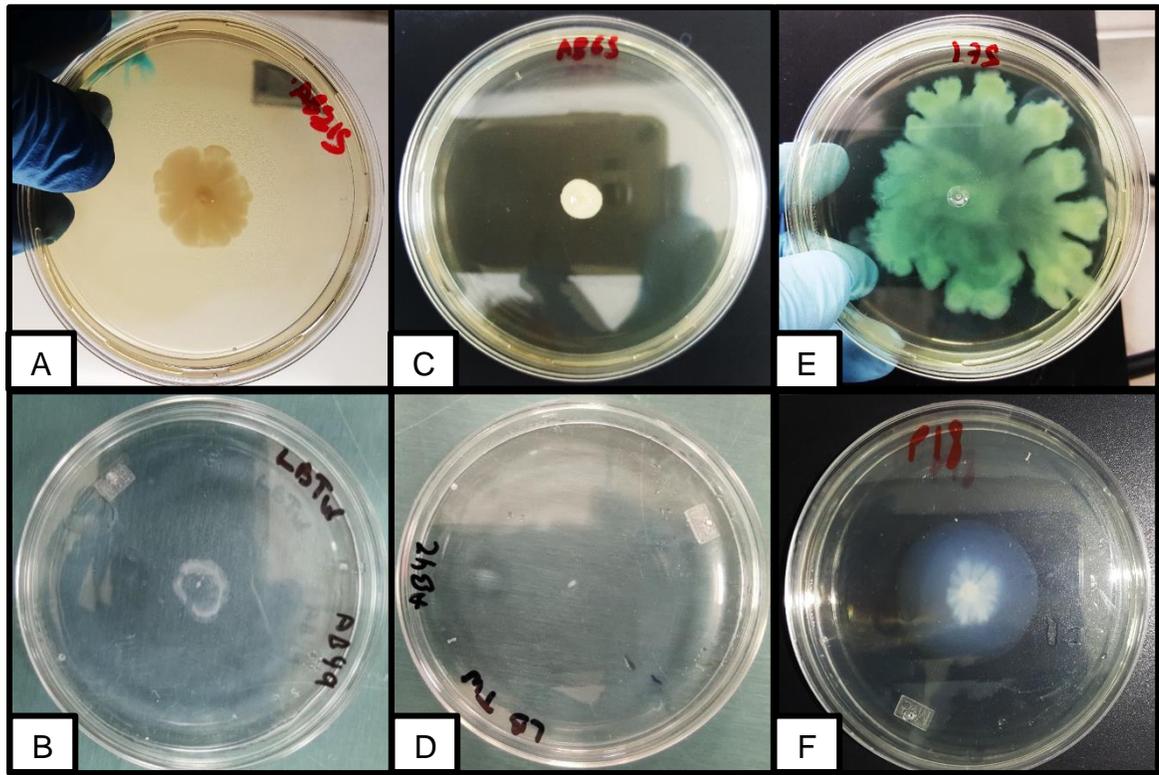


Figura 8. Prueba de motilidad presente en los aislamientos del complejo ACB. Se pueden observar resultados representativos de la motilidad tipo swarming en los recuadros superiores (A: Positivo, C: Negativo, E: Control), y de la motilidad tipo twitching en los inferiores (B: Positivo, D: Negativo, F: Control). El control de motilidad fue realizado con un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

En los cuadros E (control) y A (muestra positiva), se puede observar el desarrollo de la colonia sobre la superficie del medio con un tamaño mayor a 10 milímetros. En el cuadro C (muestra negativa), se observa desarrollo sin superar el tamaño considerado. En los cuadros F (control) y B (muestra positiva), se logra observar el halo de crecimiento en la interfase después de haber sido retirado el medio de la placa y tratados durante 10 minutos con la solución MT. En el cuadro E (muestra negativa), no se observa el halo de crecimiento en la interfase.

Tabla 16. Frecuencia de tipos de motilidad presentada por los aislamientos del complejo ACB.

Tipo de motilidad	Swarming		Twitching	
	No. de aislamientos	%	No. de aislamientos	%
Positivo	13	24.1	12	22.2
Negativo	41	75.9	42	77.8
Total	54	100	54	100

5.6. Determinación de la actividad bactericida del suero

Se realizó la prueba de la actividad bactericida del suero para observar la acción del complemento en los aislamientos analizados. Todos los aislamientos del complejo ACB fueron considerados resistentes a la acción bactericida del suero, al realizarse la lectura de la densidad óptica a 600 nm después de 24 horas de incubación y obteniendo valores de absorbancia correspondientes al desarrollo del control positivo de crecimiento.

5.7. Análisis de los Factores de Virulencia

En la Figura 9, se observa la distribución de los aislamientos de acuerdo con el número de factores de virulencia (F.V.) que presentan, siendo los aislamientos con presencia de 2 factores de virulencia los de mayor predominación (36 aislamientos, 67%) seguido de 3 factores (8 aislamientos, 15%), 4 factores (7 aislamientos, 13%) y un factor solamente (3 aislamientos, 5%).

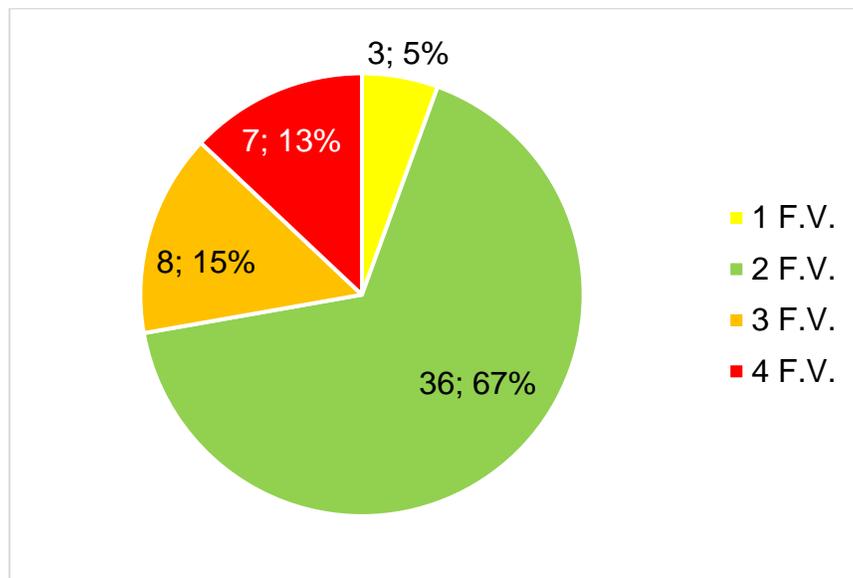


Figura 9. Distribución de los factores de virulencia dentro de los aislamientos del complejo ACB.

En cuanto a la distribución de los factores de virulencia dentro de los servicios de procedencia, se puede observar que la mayoría de los aislamientos con 3 y 4 factores de virulencia se encontraron dentro de las UCI, siendo 11 de los 15 aislamientos con estas características. Por otra parte, 14 de los 15 aislamientos con 3 y 4 factores de virulencia fueron obtenidos de sangre y de secreción bronquial.

A continuación, en la Figura 10 se muestra la distribución observada del número de factores de virulencia (FV) presentes contra el grado de multirresistencia en los aislamientos del complejo ACB, en donde se resaltan los aislamientos XDR con la presencia de 2, 3 y 4 factores de virulencia y la presencia de los 4 factores en el aislamiento clasificado como PDR.

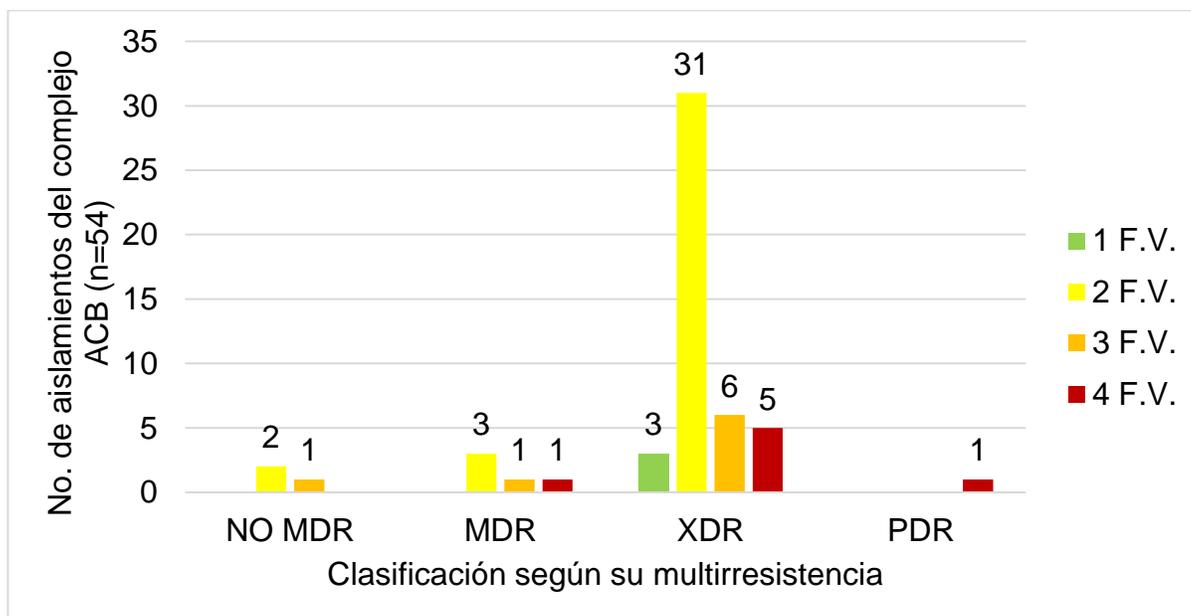


Figura 10. Distribución del número de factores de virulencia presentes en los aislamientos del complejo ACB de acuerdo con su multirresistencia.

5.8. Diferenciación molecular de *A. baumannii* por PCR de los genes *bla_{OXA-51-like}* y *rpoB*

Para la diferenciación a nivel molecular de *Acinetobacter baumannii* del complejo ACB se trabajó con la técnica descrita por Abhari y colaboradores para la amplificación de una región del gen *rpoB* con cebadores específicos para *A. baumannii*. Asimismo, se realizó la identificación en conjunto por medio de PCR punto final del gen *OXA-51-like* con cebadores específicos diseñados en este trabajo (ver anexo 9.6).

Como control positivo de amplificación se trabajó con ADN de 3 aislamientos secuenciados anteriormente, en los cuales se identificaron los 7 genes de mantenimiento correspondientes al esquema Pasteur de la tipificación multi locus de secuencias (MLST), obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 17 e identificándose todas las secuencias como *Acinetobacter baumannii*:

Tabla 17. Resultados de la identificación por MLST.

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aislamiento A	Aislamiento B	Aislamiento C
Locus	Alelo		
^{Pas} <i>cpn60</i>	2	26	26
^{Pas} <i>fusA</i>	2	2	2
^{Pas} <i>gltA</i>	2	2	2
^{Pas} <i>pyrG</i>	2	2	2
^{Pas} <i>recA</i>	2	29	29
^{Pas} <i>rplB</i>	2	4	4
^{Pas} <i>rpoB</i>	2	4	4
ST:	2	156	156

De los 54 aislamientos se amplificó el gen *rpoB* y el gen *bla*_{OXA-51-like} en el 100% de los aislamientos mediante la prueba de PCR punto final, como se muestra en la Figura 11.

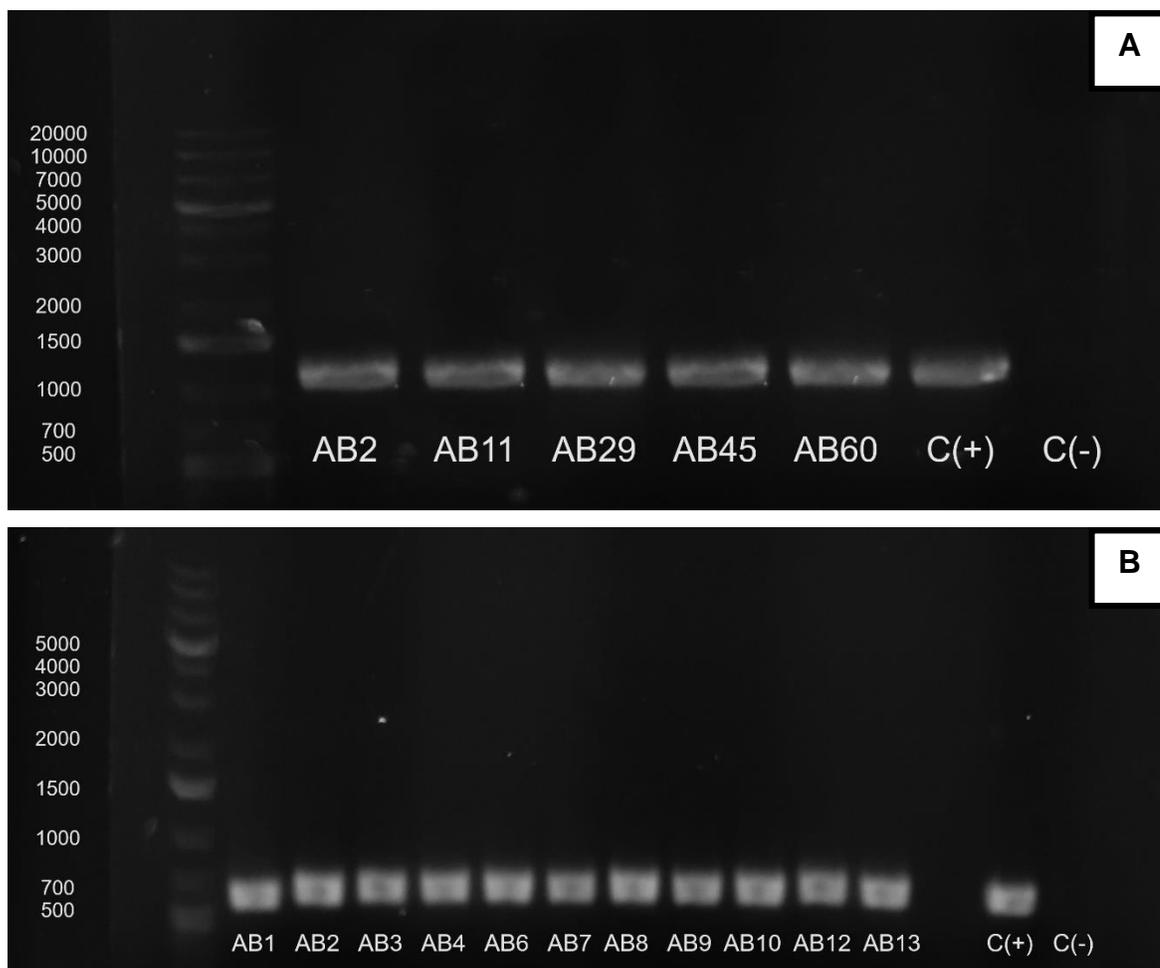


Figura 11. imágenes representativas de la identificación de los genes *rpoB* (A) y *bla_{OXA-51-like}* (B) en muestras representativas. Se puede observar las bandas representativas a los amplicones obtenidos de 1024 pb y 588 pb, respectivamente.

6 Discusión

En las últimas décadas, el aumento de la resistencia hacia los antimicrobianos se ha convertido en un problema serio de salud pública con la aparición de infecciones causadas por bacterias MDR, dejando pocas o nulas opciones terapéuticas para su tratamiento. Con la información clínica proporcionada por los hospitales se observó que los servicios de hospitalización más frecuentes con pacientes infectados por el complejo ACB fueron las unidades de cuidados intensivos, medicina interna y cirugía, con un 70.4% en conjunto (38) del total de los aislamientos y las áreas de pediatría, cunero patológico externo, ginecología y obstetricia con un 5.7% (3). En otros servicios (22.2%), se clasificó para aquellos aislamientos en los que no se contó con la información del servicio de procedencia proporcionado por el hospital, pero por su relevancia clínica, se decidió incluirlos en el estudio. Se observó que los sitios de infección más comunes de los que se obtuvieron los aislamientos fueron secreción bronquial, con un 53.7% de los aislamientos y sangre con un 25.9%. Al comparar nuestros resultados con los presentados en el boletín epidemiológico presentado por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en todo México en el año 2022, podemos observar una concordancia con la predominancia de este tipo de infecciones en las áreas del hospital donde se observa la mayor frecuencia, al haberse reportado a nivel nacional una prevalencia del 69% de infecciones asociadas a la atención de la salud dentro de servicios de medicina interna, cirugía y unidades de cuidados intensivos, además de reportar a *Acinetobacter baumannii* como el cuarto agente causal de IAAS en el país con 3,109 identificaciones (Secretaría de Salud, 2023).

Por otra parte, Morfín-Otero y colaboradores, en 2013 en un análisis sobre las infecciones de *A. baumannii* en un hospital de tercer nivel en Guadalajara durante 13 años, observaron una frecuencia mayor de los aislamientos de *A. baumannii* provenientes de medicina interna (23.7%; 18.5% en nuestro estudio), en unidad de cuidados intensivos de adultos (27.1%; 22.2% en nuestro estudio) y en cirugía (18.3%; 13.0% en nuestro estudio). En cuanto al sitio de infección, se observó una distribución menor proveniente de secreciones (48%; 53.7%) y de sangre (19.0%; 29.6%). Esta disminución puede deberse a la diferencia que hay entre el tamaño

de muestra y el tiempo que duró el estudio, el cual fue de mayor tamaño al nuestro, además del haber sido realizado dentro de un hospital de tercer nivel, ya que los hospitales participantes en este estudio son de segundo nivel. No obstante, a pesar de la diferencia que se observa, cabe resaltar que tanto en el estudio realizado por Morfin-Otero y colaboradores, como en el nuestro, estos servicios de procedencia y los sitios de infección fueron los más predominantes, mostrando así las partes críticas en las que se debe de tener un mayor cuidado y precaución dentro de los hospitales.

En los resultados sobre el perfil ampliado de resistencia, se pudo observar en los aislamientos del complejo ACB la presencia de niveles altos de resistencia (>80% de resistencia) hacia TOB, T-A, DOR y CTX, de niveles medios (>50%) de resistencia a NET y COL, y niveles menores al 45% de resistencia a TET, DOX y MIN. Estos datos son equiparables con los reportados en el informe anual RHOVE del 2015 (Secretaría de Salud, 2016), último archivo disponible de acceso público con la información epidemiológica sobre la resistencia a antimicrobianos en una gran cantidad de hospitales del país, que además engloba a 3 de los 4 hospitales de los cuales se obtuvieron las muestras, en donde se ve un aumento de 2 a 10 veces el porcentaje de aislamientos resistentes a varios antimicrobianos por parte de *A. baumannii* siendo para AMK 24.2%, P-T 4.9%, CFP 30.8% CFZ 13.9%, CTX 8.9%, IMP 8.4%, MRP 8.9%, CFL 35.8%, y A-S 9.9%.

En cuanto a la clasificación de la multirresistencia del complejo ACB, se observa que los aislamientos XDR son los predominantes (83.3%) seguidos de los aislamientos MDR (9.3%) y NO MDR (5.6%). Cabe resaltar que se identificó un aislamiento el cuál presentó la expresión fenotípica de resistencia a los 20 antimicrobianos listados para esta clasificación, por lo cual se le definió como pandrogo-resistente (PDR). Estos resultados coinciden con los resultados publicados por Moreno-Manjón y colaboradores en 2023, los cuales realizaron un análisis fenotípico y genotípico de la multirresistencia utilizando la misma clasificación propuesta por Magiorakos y colaboradores, en donde se observa una predominancia de los aislamientos clasificados como XDR (56.6%) y PDR (43.4%).

Así mismo, cabe resaltar que es la primera vez que se realiza la identificación de un aislamiento PDR en el estado de acuerdo con esta clasificación. Estos resultados demuestran la presencia de aislamientos con resistencia extrema, lo cual nos deja con pocas o nulas opciones terapéuticas para su control y tratamiento. Gales y colaboradores en 2019 mencionan la minociclina como el segundo mejor agente antimicrobiano en contra de *A. baumannii*, incluyendo aislamientos XDR y PDR. Con base en la baja resistencia a este antimicrobiano presentada por parte de los aislamientos analizados en este trabajo (20.4%), se podría considerar a la minociclina como una opción terapéutica para el tratamiento de infecciones por *Acinetobacter* XDR en el estado.

En la figura 12 en el panel A se muestra la distribución de los aislamientos con respecto al grado de multiresistencia en los distintos servicios y en el panel B, esto mismo, pero con respecto al tipo de muestra de origen; como podemos observar, predominan los aislamientos XDR y PDR tanto dentro de las unidades de cuidados intensivos, así como al ser aislados de secreciones bronquiales. Esto corresponde con los datos de otras regiones como Europa, Asia y América (Ayobami et al., 2020; Gales et al., 2019). Esta mayor recurrencia ha sido atribuida principalmente a una serie de factores de riesgo para el desarrollo de infecciones, lo cual incluye a los procedimientos invasivos que se le puedan practicar al paciente, tales como el uso de catéteres e intubación endotraqueal (Mancilla-Rojano et al., 2020); todos ellos considerados procedimientos habituales en las unidades de cuidados intensivos. Por otra parte, las infecciones causadas por *A. baumannii* han sido relacionadas directamente con el estado inmunológico que pueda presentar el paciente, al observarse un mayor riesgo en aquellos individuos con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus y también el uso de terapias antimicrobianas prolongadas con antibióticos de amplio espectro, al eliminar la microbiota que puede contribuir a evitar la colonización y propagación de bacterias patógenas (C.-Y. Lin et al., 2016). Aun cuando no contamos con esta información con respecto a los pacientes de quienes fueron obtenidos los aislamientos estudiados, se sabe que los pacientes más asiduos a las unidades de cuidados intensivos cuentan con estos perfiles.

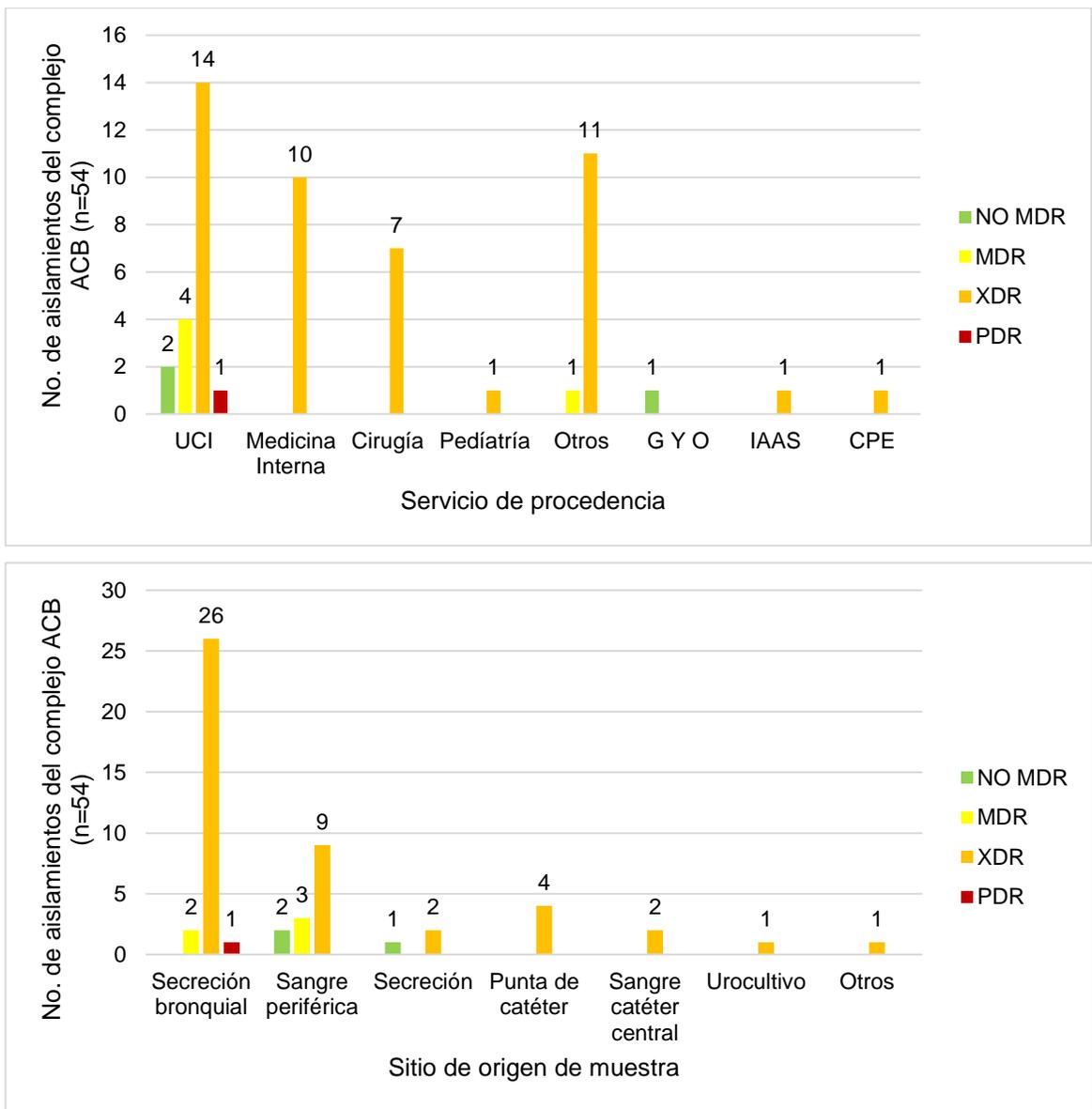


Figura 12. A) Distribución de los servicios de procedencia de los aislamientos del complejo ACB de acuerdo con su multirresistencia. B) Distribución del sitio de origen de muestra de los aislamientos del complejo ACB de acuerdo con su multirresistencia.

En cuanto a la identificación de genes de resistencia, en primer lugar, se optó por identificar la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos, medicamentos considerados como de última línea dentro de los hospitales. Para esto, se realizó la búsqueda de 9 genes que han mostrado ser prevalentes dentro de *Acinetobacter* (Ellington et al., 2007; Pournaras et al., 2006; Turton, Woodford, et al., 2006), pero

al no contar con un control positivo para la amplificación que confirmara la efectividad de las condiciones y no lograr la amplificación a partir de las muestras con el fenotipo de resistencia, se optó por buscar los 3 genes de resistencia encontrados previamente por medio de secuenciación en uno aislamientos del propio estudio, los cuales fueron *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} y *bla*_{TEM}.

Se logró identificar la presencia del gen *bla*_{OXA-24-like} en 25 de los 54 aislamientos (46.3%). Estos resultados difieren con lo encontrado en un estudio realizado en 2020 en un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México, en donde solamente se encontró una prevalencia del 5% del gen *bla*_{OXA-24-like} en aislamientos de origen hospitalario (Mancilla-Rojano et al., 2020). Por otro lado, en otro estudio realizado en los años 2017 a 2022 en un hospital de nivel terciario, se encontró que el 92% de los aislamientos analizados presentaron este gen (Castillo Bejarano et al., 2023). Así mismo, Moreno-Manjón y colaboradores en 2023 encontraron la presencia del gen *bla*_{OXA-72}, el cual pertenece a la familia del gen *bla*_{OXA-24-like} en el 90.8% de los aislamientos. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en este trabajo, nos brindan información actual sobre la alta prevalencia que tiene el gen *bla*_{OXA-24-like} en *Acinetobacter baumannii* en México, siendo esto una posible causa de la alta resistencia a carbapenémicos dentro del país.

La identificación de los factores de virulencia presentados por estas bacterias nos permite identificar la presencia de otros factores, fuera de la resistencia a antimicrobianos que puedan contribuir a la colonización, infección y persistencia de este tipo de bacterias. En este sentido, los resultados de la determinación de formación de biopelícula nos permiten identificar aquellas bacterias que puedan presentar el desarrollo de una compleja matriz, que le servirá a la bacteria como protección a la respuesta del hospedero, contra una gran variedad de antimicrobianos y le permitirá sobrevivir en superficies, tales como el equipo médico con el cual ha estado en contacto el paciente infectado.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de las muestras obtenidas del complejo ACB presentaron la capacidad de formación de biopelícula (88.9% de los aislamientos). Esta información coincide con lo reportado en un estudio realizado

en 2016, en donde se observó que la mayoría de los aislamientos de *A. baumannii* provenientes de sangre periférica y secreción bronquial eran capaces de formar varios niveles de biopelícula (Vijayakumar et al., 2016).

En cuanto a la motilidad bacteriana, la cual es un proceso complejo que emplea una gran variedad de mecanismos mediados principalmente por la presencia de flagelos y/o pilis, se encontró que el 24.1% de los aislamientos del complejo ACB presentaron un halo de crecimiento mayor a 10 mm en una superficie semisólida, por lo cual estos fueron considerados con motilidad tipo “swarming” también conocida como motilidad asociada a la superficie. Se consideraron como swarming negativos a aquellos que, a pesar de presentar un halo de crecimiento mayor a 10 mm, presentó una morfología uniforme aislada al centro de la placa correspondiente a la morfología que se observa cuando hay una motilidad de tipo “sliding” (Clemmer et al., 2011), la cual corresponde a la motilidad observada por el desplazamiento sobre una superficie debido al crecimiento bacteriano. Por otra parte, se encontró que el 22.2% de los aislamientos del complejo ACB fueron considerados como twitching positivos. En este estudio se muestra que la motilidad tipo twitching y swarming son características fenotípicas distintas entre sí en los aislamientos del complejo ACB, en contraste con lo reportado en un estudio realizado por Eijkelkamp y colaboradores en 2011, los cuales observaron la presencia aislamientos swarming positivos que no presentaron motilidad tipo twitching. Cabe resaltar que al existir una gran variedad de técnicas para la identificación de la motilidad que presentan las bacterias (Palma et al., 2022), desde las técnicas *in vivo* con animales, las microscópicas y las macroscópicas en medios de cultivo, como la utilizada en este proyecto, se debe de buscar estandarizar una o varias técnicas dentro de los centros epidemiológicos que permita la comparación de los resultados tanto a nivel mundial como local. En este sentido, algunas de las ventajas que se pueden tener con esta técnica es la facilidad de llevar a cabo la técnica, al no requerir algún equipo especial y ser una técnica de visualización macroscópica, lo que podría llevarlo a ser implementado dentro de los laboratorios clínicos de los hospitales. Algunas desventajas que puede presentar esta técnica, es la gran variedad de factores que se deben de tomar en cuenta que pueden afectar

directamente las pruebas, tales como la temperatura, la concentración de sales del medio, la humedad, el tipo de medio y cantidad de agarosa que se usa, así como el pH y la cantidad de inóculo con la que se trabaja (Pearson, 2019).

Por lo tanto, estos resultados se pueden complementar con la búsqueda a nivel molecular de genes involucrados directamente con la motilidad, tales como el gen *Csu* y la familia de genes *pil*, que son primordiales para el ensamblaje de los pilis tipo I y IV, respectivamente, los cuales además de contribuir a la motilidad bacteriana, colaboran para la formación de biopelículas y la virulencia en *Acinetobacter* (Ahmad et al., 2023; Mea et al., 2021).

Con respecto a la prueba del efecto bactericida del suero para identificar la evasión del complemento como factor de virulencia, se observó que todos los aislamientos del complejo ACB fueron resistentes el efecto bactericida que puede presentar la respuesta inmune innata como una primera línea de defensa hacia el combate de este tipo de infecciones. Sanchez-Larrayoz y colaboradores en 2017 observaron que la resistencia al suero es una característica común presente en los aislamientos de *A. baumannii*, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo.

Con la presencia de este tipo de aislamientos, con múltiples factores que les permiten su adherencia y fijación a superficies tanto bióticas como abióticas, se deben de tomar en consideración estrategias de limpieza que permitan eliminar fuentes que produzcan brotes de infecciones MDR dentro de los hospitales. Varios autores (La Forgia et al., 2010; Strassle et al., 2012; Barnes et al., 2014) han demostrado que una limpieza adecuada de manos por parte del personal de salud, así como una limpieza continua del ambiente hospitalario con desinfectantes como el hipoclorito de sodio, permiten la reducción significativa en la transmisión de este tipo de infecciones.

Se ha demostrado que este gen puede diseminarse entre diferentes especies dentro de género *Acinetobacter*, tales como *Acinetobacter nosocomialis* y *Acinetobacter haemolyticus* (Grosso et al., 2012), demostrando así la gran importancia que pudiera llegar a tener este gen para la diseminación de la resistencia a carbapenémicos dentro del género *Acinetobacter*.

La diferenciación de especies dentro del complejo ACB dentro de los hospitales se ha vuelto de gran importancia debido a que *A. baumannii* es la especie que forma parte de la mayoría de los brotes hospitalarios. Para este trabajo, se realizó la identificación de 3 aislamientos como referencia como *Acinetobacter baumannii* a partir de la tipificación multilocus de secuencias (MLST). Se trabajó con esquema Pasteur debido a que se ha encontrado que el esquema Oxford se puede ver afectado por la presencia de un locus alternativo del gen *gdhB* en cepas de *A. baumannii* (Gaiarsa et al., 2019).

Se encontró la presencia de ST 2 y 156, ambos tipos de secuencia han sido identificados en brotes hospitalarios en Europa (Cherubini et al., 2022), Asia (Yu et al., 2021) y América. En este sentido, en México también se ha identificado la presencia de este tipo de secuencia a nivel hospitalario (Mancilla-Rojano et al., 2020). Asimismo, la presencia del ST 156 coincide con diversos estudios en donde ha prevalecido como un clado predominante en América Latina, principalmente en México (Müller et al., 2023), identificado como el tipo de secuencia de mayor prevalencia dentro de un hospital de tercer nivel, con un 27.27% de los aislamientos (Mancilla-Rojano et al., 2020). En consecuencia, es deseable realizar la tipificación de los demás aislamientos para poder obtener datos de prevalencia equiparables con los obtenidos en los diversos estudios que se han realizado en el país y así poder reafirmar la presencia de secuencias tipos endémicas en México.

El gen *bla*_{OXA-51-like} ha sido propuesto y utilizado por una gran cantidad de grupos de investigación para la diferenciación de *A. baumannii* dentro de los estudios epidemiológicos que realizan (Mahdi et al., 2010; Turton, Woodford, et al., 2006), esto debido a que se ha observado la presencia intrínseca que presenta este gen dentro de *A. baumannii*. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de este gen en otras bacterias del género *Acinetobacter* (Y.-T. Lee et al., 2009), así como la ausencia en algunas cepas de *A. baumannii* (Tolba et al., 2019). Por lo que no ha sido aceptado como un método universal para la identificación de la especie.

En búsqueda de otros métodos moleculares que permitan la diferenciación a nivel de especie del género *Acinetobacter*, se ha sugerido la secuenciación del gen *rpoB*,

que es el que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa, esto debido a su gran especificidad para poder diferenciar las especies que forman parte del complejo ACB (Vijayakumar et al., 2019). Los resultados obtenidos en este trabajo reafirman la técnica propuesta por Abhari y colaboradores en 2021 para la diferenciación de *A. baumannii* del complejo ACB. De igual manera, los resultados obtenidos para la identificación del gen *bla_{OXA-51-like}* coinciden con los estudios realizados en el país, en donde todos los aislamientos presentaron este gen y fue utilizado como confirmación de la especie *A. baumannii* (Garza-González et al., 2021; Mancilla-Rojano et al., 2020; Moreno-Manjón et al., 2023; Morfín-Otero et al., 2013). De este modo, se vuelve valioso continuar con la creación de un protocolo que permita implementar los dos genes en una sola técnica de amplificación para así poder tener una técnica molecular que se pudiera llegar a aplicar a nivel hospitalario dentro del país, para así poder contribuir con información epidemiológica más fidedigna.

7 Conclusiones

Se realizó la caracterización fenotípica y molecular de aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* de origen hospitalario.

Se identificaron altos niveles de resistencia antimicrobiana, así como la prevalencia de múltiples genes de resistencia y se caracterizaron los fenotipos de virulencia de formación de biopelícula, tipo de motilidad y resistencia al efecto bactericida del suero humano en aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.

Se logró diferenciar por métodos moleculares a los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.

Este trabajo resalta la alta incidencia que se tiene de aislamientos clínicos con multidrogo-resistencia, con resistencia extrema y pandrogo-resistencia, con la expresión fenotípica de múltiples factores de virulencia y prevalencia a nivel molecular de genes de resistencia a carbapenémicos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan un problema grave de salud pública en el estado, debido al riesgo potencial que se puede presentar al poder contribuir directamente en la aparición de brotes hospitalarios de difícil control, así como un factor de riesgo muy importante en los pacientes que se encuentran hospitalizados en estado crítico.

Estas características resaltan la necesidad de tener una mejor vigilancia epidemiológica dentro de los centros de atención hospitalaria para poder establecer medidas preventivas y de control en la diseminación de estos microorganismos y de esta manera poder tratar específicamente a este tipo de microorganismos multirresistentes con antimicrobianos que presenten un efecto terapéutico exitoso.

Se presentaron algunas limitaciones en cuanto a la identificación de los genes de resistencia a carbapenémicos en este trabajo, a pesar de esto, se logró distinguir la presencia de gen *bla*_{OXA-24-like}, el cual ha mostrado tener una alta incidencia en las infecciones resistentes a carbapenémicos en el país.

La identificación de regiones específicas de genes tales como *bla_{oxa-51-like}* y *rpoB*, representan una opción viable para la diferenciación de *Acinetobacter baumannii* a nivel de especie dentro del complejo ABC, para poder así contribuir a generar información epidemiológica específica sobre esta especie de importancia crítica a nivel hospitalario.

8 Referencias

- Abhari, S. S., Azizi, O., Modiri, L., Aslani, M. M., Assmar, M., Fereshteh, S., & Badmasti, F. (2021). Two new rapid PCR-based methods for identification of *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples. *Molecular and Cellular Probes*, *58*, 101732. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101732>
- Ahmad, I., Nadeem, A., Mushtaq, F., Zlatkov, N., Shahzad, M., Zavialov, A. V., Wai, S. N., & Uhlin, B. E. (2023). Csu pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00465-6>
- Almasaudi, S. B. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *25*(3), 586-596. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>
- Antunes, L. C. S., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, *71*(3), 292-301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Ayobami, O., Willrich, N., Suwono, B., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2020). The epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* species in Europe: Analysis of EARS-Net data from 2013 to 2017. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *9*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00750-5>
- Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in

- a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics*, 9(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>
- Babapour, E., Haddadi, A., Mirnejad, R., Angaji, S.-A., & Amirmozafari, N. (2016). Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 528-533.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.04.006>
- Bagińska, N., Cieślik, M., Górski, A., & Jończyk-Matysiak, E. (2021). The Role of Antibiotic Resistant *A. baumannii* in the Pathogenesis of Urinary Tract Infection and the Potential of Its Treatment with the Use of Bacteriophage Therapy. *Antibiotics*, 10(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10030281>
- Castillo Bejarano, J. I., Llaca Díaz, J., e la O Cavazos, M. E., Sánchez Alanís, H., Mascareñas de los Santos, A. H., Espinosa-Villaseñor, F., Aguayo Samaniego, R., Siller Rodríguez, D., & Casillas Vega, N. (2023). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection in Children From a Third-Level Hospital in Mexico: Clinical Characteristics and Molecular Epidemiology. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 12(7), 431-435. <https://doi.org/10.1093/jpids/piad046>
- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Cherubini, S., Perilli, M., Segatore, B., Fazii, P., Parruti, G., Frattari, A., Amicosante, G., & Piccirilli, A. (2022). Whole-Genome Sequencing of ST2 *A. baumannii*

- Causing Bloodstream Infections in COVID-19 Patients. *Antibiotics*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070955>
- Clemmer, K. M., Bonomo, R. A., & Rather, P. N. (2011a). Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*, 157(Pt 9), Article Pt 9. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049791-0>
- Clemmer, K. M., Bonomo, R. A., & Rather, P. N. (2011b). Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology*, 157(Pt 9), 2534-2544. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049791-0>
- Doi, Y., Murray, G. L., & Peleg, A. Y. (2015a). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36(1), 85-98. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1398388>
- Doi, Y., Murray, G. L., & Peleg, A. Y. (2015b). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance—Treatment Options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36(1), Article 1. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1398388>
- Dortet, L., Potron, A., Bonnin, R. A., Plesiat, P., Naas, T., Filloux, A., & Larrouy-Maumus, G. (2018). Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Scientific Reports*, 8, 16910. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35041-y>
- Eijkelkamp, B. A., Stroehler, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Lo, R. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 323(1), 44-51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x>

- Ellington, M. J., Kistler, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2007). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 321-322. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl481>
- Gaiarsa, S., Batisti Biffignandi, G., Esposito, E. P., Castelli, M., Jolley, K. A., Brisse, S., Sasser, D., & Zarrilli, R. (2019). Comparative Analysis of the Two Acinetobacter baumannii Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00930>
- Gales, A. C., Seifert, H., Gur, D., Castanheira, M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2019). Antimicrobial Susceptibility of Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii Complex and Stenotrophomonas maltophilia Clinical Isolates: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016). *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Suppl 1), S34-S46. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy293>
- García-Patiño, M. G., García-Contreras, R., & Licona-Limón, P. (2017). The Immune Response against Acinetobacter baumannii, an Emerging Pathogen in Nosocomial Infections. *Frontiers in Immunology*, 8, 441. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00441>
- Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Bobadilla-del-Valle, M., Ponce-de-León-Garduño, L. A., Esteban-Kenel, V., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., López-Jácome, L. E., Colin-Castro, C. A., Franco-Cendejas, R., Flores-Treviño, S., Morfín-Otero, R., Rojas-Larios, F., Mena-Ramírez, J. P., Fong-Camargo, M. G., Morales-De-la-Peña, C. T., García-

- Mendoza, L., Choy-Chang, E. V., ... Camacho-Ortiz, A. (2021). Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network. *PLOS ONE*, *16*(3), e0248614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248614>
- Garza-González, E., Franco-Cendejas, R., Morfín-Otero, R., Echaniz-Aviles, G., Rojas-Larios, F., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Ponce-de-León, A., Rodríguez-Noriega, E., Alavez-Ramírez, N., Mena-Ramirez, J. P., Rincón-Zuno, J., Fong-Camargo, M. G., Morales-De-la-Peña, C. T., Huerta-Baltazar, C. R., López-Jacome, L. E., Carnalla-Barajas, M. N., Soto-Noguerón, A., Sanchez-Francia, D., ... Camacho-Ortiz, A. (2020). The Evolution of Antimicrobial Resistance in Mexico During the Last Decade: Results from the INVIFAR Group. *Microbial Drug Resistance*, *26*(11), 1372-1382. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0354>
- Garza-González, E., Llaca-Díaz, J. M., Bosques-Padilla, F. J., & González, G. M. (2010). Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Mexico: Special Focus on *Acinetobacter baumannii*. *Chemotherapy*, *56*(4), 275-279. <https://doi.org/10.1159/000319903>
- Grosso, F., Quinteira, S., Poirel, L., Novais, Â., & Peixe, L. (2012). Role of Common blaOXA-24/OXA-40-Carrying Platforms and Plasmids in the Spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* Species Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(7), 3969-3972. <https://doi.org/10.1128/aac.06255-11>

- Harding, C. M., Hennon, S. W., & Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(2), 91-102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annual Review of Microbiology*, *57*(1), 249-273. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014>
- Hudzicki, J. (2009, diciembre). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol | ASM.org*. <https://asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
- Kim, S. W., Choi, C. H., Moon, D. C., Jin, J. S., Lee, J. H., Shin, J.-H., Kim, J. M., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., & Lee, J. C. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, *301*(2), 224-231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01820.x>
- King, L. B., Swiatlo, E., Swiatlo, A., & McDaniel, L. S. (2009). Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *55*(3), 414-421. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00538.x>
- La Scola, B., Gundi, V. A. K. B., Khamis, A., & Raoult, D. (2006). Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(3), 827-832. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.827-832.2006>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>

Lee, Y.-T., Turton, J. F., Chen, T.-L., Wu, R. C.-C., Chang, W.-C., Fung, C.-P., Chen, C.-P., Cho, W.-L., Huang, L.-Y., & Siu, L. K. (2009). First Identification of *bla*_{OXA-51-like} in Non-*baumannii* Acinetobacter spp. *Journal of Chemotherapy*, 21(5), 514-520. <https://doi.org/10.1179/joc.2009.21.5.514>

Lin, C.-Y., Chen, Y.-M., Lin, M.-C., Chang, Y.-P., Chao, T.-Y., Wang, C.-C., Tsai, Y.-C., Shen, L. S., Li, C.-L., & Lin, A.-S. (2016). Risk factors of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii recurrence after successful eradication in ventilated patients. *Biomedical Journal*, 39(2), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.07.001>

Lin, M.-F., & Lan, C.-Y. (2014). Antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 2(12), 787-814. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.787>

Magda, M., Bettoni, S., Laabei, M., Fairley, D., Russo, T. A., Riesbeck, K., & Blom, A. M. (2022). Clinical Isolates of Acinetobacter spp. Are Highly Serum Resistant Despite Efficient Recognition by the Complement System. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.814193>

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-

resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Mahdi, A., Mohammad, N., Morovat, T., Mhammad-Mahdi, F., Namam-Ali, A., Setareh, S., Mohammad, E., Amir, A., Abbas, M., & Ali, H. (2010). Rapid identification of Iranian *Acinetobacter Baumannii* strains by single PCR assay using BLA_{oxa-51} -like carbapenemase and evaluation of the antimicrobial resistance profiles of the isolates in: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* Volume 57 Issue 2 (2010). *Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 57(2). <https://akjournals.com/view/journals/030/57/2/article-p87.xml>

Mancilla-Rojano, J., Ochoa, S. A., Reyes-Grajeda, J. P., Flores, V., Medina-Contreras, O., Espinosa-Mazariego, K., Parra-Ortega, I., Rosa-Zamboni, D. D. L., Castellanos-Cruz, M. del C., Arellano-Galindo, J., Cevallos, M. A., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., & Cruz-Córdova, A. (2020a). Molecular Epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex Isolated From Children at the Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Frontiers in Microbiology*, 11, 576673. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.576673>

Mancilla-Rojano, J., Ochoa, S. A., Reyes-Grajeda, J. P., Flores, V., Medina-Contreras, O., Espinosa-Mazariego, K., Parra-Ortega, I., Rosa-Zamboni, D. D. L., Castellanos-Cruz, M. del C., Arellano-Galindo, J., Cevallos, M. A., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., & Cruz-Córdova, A. (2020b). Molecular Epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter*

- baumannii Complex Isolated From Children at the Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Frontiers in Microbiology*, 11, 576673.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.576673>
- Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. (2016). Antimicrobial Resistance. *JAMA*, 316(11), 1193-1204.
<https://doi.org/10.1001/jama.2016.11764>
- Mea, H. J., Yong, P. V. C., & Wong, E. H. (2021). An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiological Research*, 247, 126722.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126722>
- Melton, C. N., & Anderson, G. G. (2019). Biofilms and Disease: A Persistent Threat. En T. M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)* (pp. 510-519). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.66119-6>
- Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D. F., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St. Michael, F., Cox, A. D., Adler, B., Nation, R. L., Li, J., & Boyce, J. D. (2010). Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 4971-4977.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00834-10>
- Moghadasi, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Karami-Zarandi, M., Rahdar, H. A., Jasemi, S., & Feizabadi, M. M. (s. f.). *Investigation of antimicrobial susceptibility patterns and frequency of bla OXA genes in carbapenem resistant Acinetobacter baumannii strains*. 13.

- Moreno-Manjón, J., Castillo-Ramírez, S., Jolley, K. A., Maiden, M. C. J., Gayosso-Vázquez, C., Fernández-Vázquez, J. L., Mateo-Estrada, V., Giono-Cerezo, S., & Alcántar-Curiel, M. D. (2023). *Acinetobacter baumannii* IC2 and IC5 Isolates with Co-Existing blaOXA-143-like and blaOXA-72 and Exhibiting Strong Biofilm Formation in a Mexican Hospital. *Microorganisms*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092316>
- Morfín-Otero, R., Alcántar-Curiel, M. D., Rocha, M. J., Alpuche-Aranda, C. M., Santos-Preciado, J. I., Gayosso-Vázquez, C., Araiza-Navarro, J. R., Flores-Vaca, M., Esparza-Ahumada, S., González-Díaz, E., Pérez-Gómez, H. R., & Rodríguez-Noriega, E. (2013a). *Acinetobacter baumannii* Infections in a Tertiary Care Hospital in Mexico over the Past 13 Years. *Chemotherapy*, 59(1), 57-65. <https://doi.org/10.1159/000351098>
- Morfín-Otero, R., Alcántar-Curiel, M. D., Rocha, M. J., Alpuche-Aranda, C. M., Santos-Preciado, J. I., Gayosso-Vázquez, C., Araiza-Navarro, J. R., Flores-Vaca, M., Esparza-Ahumada, S., González-Díaz, E., Pérez-Gómez, H. R., & Rodríguez-Noriega, E. (2013b). *Acinetobacter baumannii* Infections in a Tertiary Care Hospital in Mexico over the Past 13 Years. *Chemotherapy*, 59(1), Article 1. <https://doi.org/10.1159/000351098>
- Müller, C., Reuter, S., Wille, J., Xanthopoulou, K., Stefanik, D., Grundmann, H., Higgins, P. G., & Seifert, H. (2023). A global view on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 0(0), e02260-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.02260-23>
- Nguyen, M., & Joshi, S. (2021). Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their Importance in Hospital-acquired Infections: A Scientific

- Review. *Journal of Applied Microbiology*, 131.
<https://doi.org/10.1111/jam.15130>
- O'Donnell, J. N., Putra, V., & Lodise, T. P. (2021). Treatment of patients with serious infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: How viable are the current options? *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 41(9), 762-780.
<https://doi.org/10.1002/phar.2607>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 47, 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Palma, V., Gutiérrez, M. S., Vargas, O., Parthasarathy, R., & Navarrete, P. (2022). Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions. *Microorganisms*, 10(3), 563.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10030563>
- Pearson, M. M. (2019). Methods for Studying Swarming and Swimming Motility. En M. M. Pearson (Ed.), *Proteus mirabilis: Methods and Protocols* (pp. 15-25). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9601-8_3
- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 568-585.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
- Pournaras, S., Markogiannakis, A., Ikonomidis, A., Kondyli, L., Bethimouti, K., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., & Tsakris, A. (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing

- OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 557-561. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl004>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Secretaría de Salud. (2016). *Informe Anual 2015 RHOVE*. Dirección General de Epidemiología.
- Secretaría de Salud. (2023). *Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE)*. Dirección General de Epidemiología.
- Shukla, S. K., & Rao, T. S. (2017). *An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate* [Preprint]. Microbiology. <https://doi.org/10.1101/100214>
- Tolba, S., El Shatoury, E., & Abo AlNasr, N. (2019). Prevalence of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in some Egyptian Hospitals: Evaluation of the Use of blaOXA-51-like Gene as Species Specific Marker for CRAB. *Egyptian Journal of Botany*, 0(0), 0-0. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2019.10095.1297>
- Turnbull, L., & Whitchurch, C. B. (2014). Motility Assay: Twitching Motility. En A. Filloux & J.-L. Ramos (Eds.), *Pseudomonas Methods and Protocols* (pp. 73-86). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_9
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., & Pitt, T. L. (2006). The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*: Role of ISAba1 in

- expression of OXA carbapenemase genes. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x>
- Turton, J. F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M. E., & Pitt, T. L. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2974-2976. <https://doi.org/10.1128/JCM.01021-06>
- Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S. G., Juárez Vignon-Whaley, J. J., Abello Vaamonde, J. A., Padró Alonzo, L. A., Rivera Reséndiz, A., Muleiro Álvarez, M., Vega López, E. N., Franyuti-Kelly, G., Álvarez-Hernández, D. A., Moncaleano Guzmán, V., Juárez Bañuelos, J. E., Marcos Felix, J., González Barrios, J. A., & Barrientos Fortes, T. (2020). *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040205>
- Vijayakumar, S., Biswas, I., & Veeraraghavan, B. (2019). Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: An update. *Future Science OA*, 5(6), FSO395. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2018-0127>
- Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., & Biswas, I. (2016). Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Frontiers in Public Health*, 4, 105. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00105>
- Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Czobor, I. B., & Chifiriuc, M. C. (2020). Antibiotic Resistance Profiles, Molecular Mechanisms and Innovative Treatment Strategies of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 8(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060935>

- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: A Century of Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 409-447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>
- Yu, K., Zeng, W., Xu, Y., Liao, W., Xu, W., Zhou, T., Cao, J., & Chen, L. (2021). Bloodstream infections caused by ST2 Acinetobacter baumannii: Risk factors, antibiotic regimens, and virulence over 6 years period in China. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00876-6>
- Zeighami, H., Valadkhani, F., Shapouri, R., Samadi, E., & Haghi, F. (2019). Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming Acinetobacter baumannii isolated from intensive care unit patients. *BMC Infectious Diseases*, 19, 629. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4272-0>

9 Anexos

9.1. Extracción de ADN para bacterias Gram negativas.

Lisado del ADN

- Se centrifuga 1 mL de caldo inoculado con la bacteria durante 24 horas (2 x 10⁹ bacterias Gram negativas) y se resuspende el sedimento en 180 µL de Buffer de digestión PureLink® y 20 µL de Proteinasa K para lisar las bacterias, mezclando con un vortex.
- Incubar a 55 °C mezclando ocasionalmente hasta que la lisis esté completa (30 minutos a una hora).
- Agregar 20 µL de RNasa A al lisado, mezclando con un vortex e incubar a temperatura ambiente por dos minutos.
- Agregar 200 µL de Buffer Genómico de Lisis/Unión PureLink® y mezclar con un vortex hasta obtener una solución homogénea.
- Agregar 200 µL de etanol al 96-100% al lisado, mezclando con un vortex por 5 segundos para obtener una solución homogénea.

Unión del ADN

- Colocar el lisado (aproximadamente 640 µL) en una columna de centrifugación colocada en un tubo de recolección y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el tubo y colocar otro tubo de recolección limpio.

Lavado del ADN

- Agregar 500 µL de Buffer de lavado 1 a la columna y centrifugar a 10,000 x g por un minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el tubo y colocar otro tubo de recolección limpio.
- Agregar 500 µL de Buffer de lavado 2 a la columna y centrifugar a máxima velocidad por tres minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el tubo y colocar otro tubo de recolección limpio.

Elución del ADN

- Colocar la columna en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y agregar 50 µL de Buffer genómico de elución PureLink® a la columna.

- Incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar a máxima velocidad por un minuto a temperatura ambiente.
- Para extraer la mayor cantidad de ADN, realizar una segunda elución utilizando el mismo volumen en otro tubo eppendorf estéril de 1.5 mL.
- Centrifugar a velocidad máxima por 1.5 minutos a temperatura.
- Los tubos contienen el ADN purificado. Remover y descartar la columna.
- Almacenar el ADN a -20 °C para su uso posterior.

9.2. Preparación de agar LB Swarming

Para 40 placas de agar LB Swarming:

- Composición: 8 g de caldo LB (10 g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 10g/L cloruro de sodio) y 1.6 g de agar grado bacteriológico.
- Agregar en un matraz con 400 mL de agua destilada, los 8 g de caldo LB agitando vigorosamente para evitar la formación de grumos.
- Agregar los 1.6 g de agar con agitación constante para evitar la formación de grumos.
- Una vez realizada la suspensión del caldo LB con el agar en agua, colocar en autoclave a 121 °C - 20 psi durante 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y dejar enfriar a 45-50 °C.
- Añadir en cada placa 10 mL del agar LB Swarming (si la cantidad agregada no cubre la placa, cubrir y homogeneizar agitando un poco la placa).
- Dejar reposar las placas dentro de una campana de flujo durante 30 minutos.

9.3. Preparación de agar LB Twitching

Para 40 placas de agar LB Twitching:

- Composición: 8 g de caldo LB (10 g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 10g/L cloruro de sodio) y 4 g de agar grado bacteriológico.
- Agregar en un matraz con 400 mL de agua destilada, los 8 g de caldo LB agitando vigorosamente para evitar la formación de grumos.
- Agregar los 4 g de agar con agitación constante para evitar la formación de grumos.
- Una vez realizada la suspensión del caldo LB con el agar en agua, colocar en autoclave a 121 °C - 20 psi durante 15 minutos.
- Retirar de la autoclave y dejar enfriar a 45-50 °C.
- Añadir en cada placa 10 mL del agar LB Twitching (si la cantidad agregada no cubre la placa, cubrir y homogeneizar agitando un poco la placa).
- Dejar reposar las placas dentro de una campana de flujo durante 30 minutos.

9.4. Preparación de solución TM

Para 1 L de solución TM, agregar en un matraz:

- 100 mL de ácido acético glacial.
- 400 mL de agua destilada.
- 500 mL de metanol.

Al hacer la mezcla, transferir a un frasco ámbar y dejar reposar durante 30 min.

9.5. Resultados perfil ampliado de resistencia

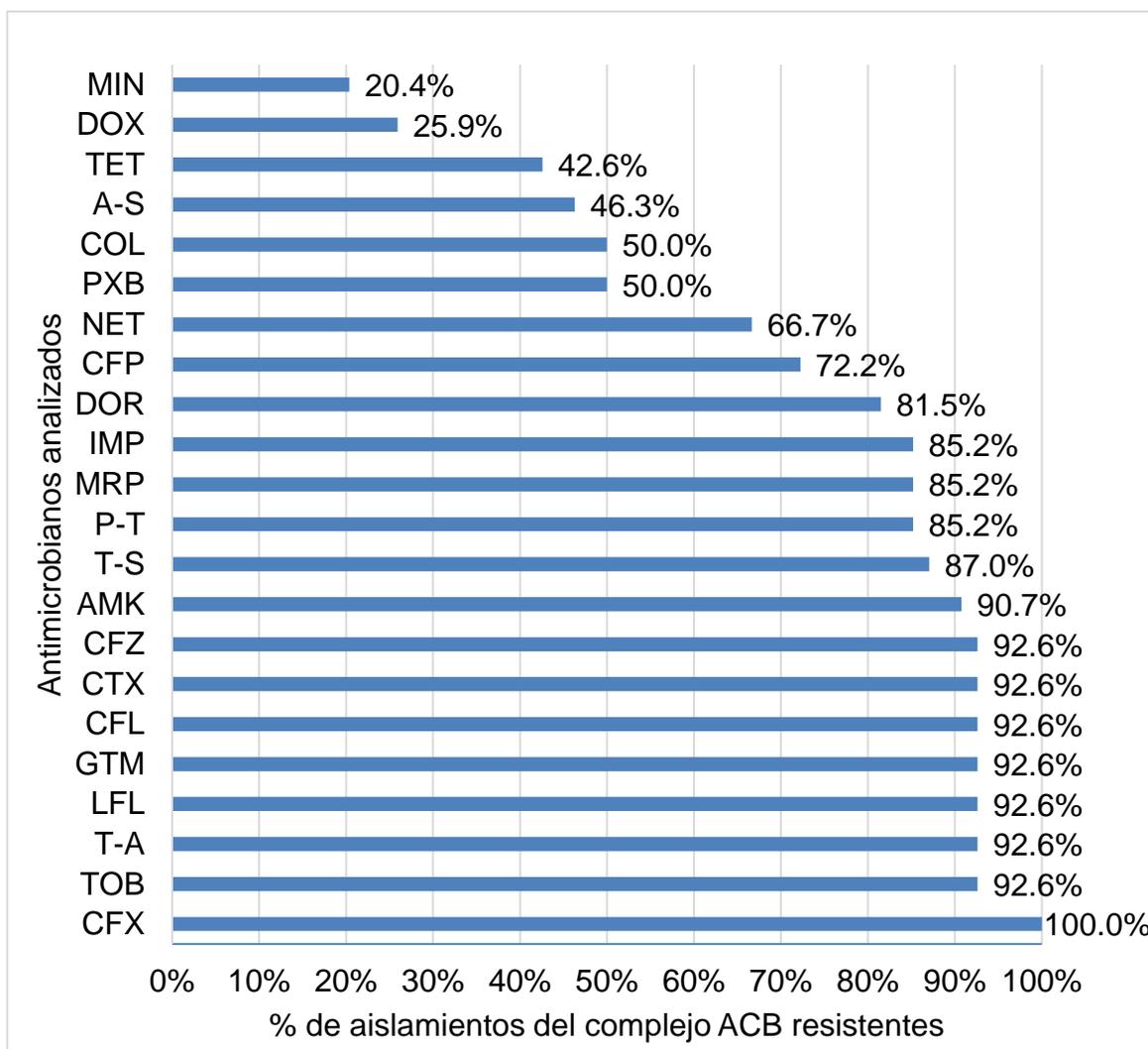


Figura 13. Porcentaje de aislamientos del complejo ACB resistentes a los diferentes antimicrobianos indicados para la clasificación de su multirresistencia, se incluyen los antimicrobianos probados por los laboratorios de los hospitales participantes, así como aquellos probados en este trabajo. **Nota: Ver abreviaturas en la Tabla 4.**

9.6. Secuencia de genes utilizados en este estudio

A continuación, se muestra la secuencia de los genes utilizados para la identificación de genes de resistencia a carbapenémicos y para la diferenciación de *Acinetobacter baumannii* del complejo ACB. Se puede observar resaltado el amplicón obtenido a partir de los cebadores diseñados, los cuales se encuentran subrayados de color amarillo dentro de la secuencia de cada gen.

> Gen *bla*_{OXA-24-like}

```
atgaaaaaatttatacttctatattcagcatttctattctagtttctctcagtgcatgttcatctattaaaactaaatctgaagataatttcat  
atcttctcagcaacatgaaaaagctattaaaagctattttgatgaagctcaaacacaggggtgaattattataaagagggtaaa  
aatcttagcacctatggaatgctctgacgagcaataaagaatattgtccctgcatcaacatttaagatgctaaatgcttaatc  
gggctagaaaatcataaagcaacaacaatgagattttcaaatgggatggtaaaaaagaacttatcctatgtgggagaaagat  
atgacttttaggtgaggcaatggcattgtcagcagttccagtatatcaagagcttgaagacgggactggcctagagctaatgag  
aaagaagtaaagcgggttaattttgaaatacaaatattggaacacaggtcgataattttggttagttggccccttaaaattaca  
ccagtacaagaagtaattttgccgatgacctgacataaccgattaccttttaattagaaactcaagaagaagtaaaaaaat  
gcttctaattaaagaagtaaatggtagtaagatttgcaaaaagggatggggaatggatgtactccacaggtaggttggtga  
ctggttgggtggagcaagctaattggaaaaaatcccctttcgcctcaacttagaaaatgaaagaaggaatgtctggttctattcgta  
gaaattacttataagtcgctagaaaatcttgaatcatttaa
```

> Gen *bla*_{TEM}

```
atgagtattcaacatttccgtgctcgcccttattccctttttgctgcatgttgccttctggttttctcaccagaaacgctgggaaagt  
aaaagatgctgaagatcagttgggtgacgagtggttacatcgagctggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttctg  
ccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttaaagttctgctatgtgggtgctggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagc  
aactcggctgccgcatacactattctcagaatgactgggtgagtaactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgac  
agtaagagaattatgagtgctgccataaccatgagtgataaacctggggccaacttacttctgacaaatcgatcggaggaccgaa  
ggagctaaccgctttttgcacaacatggggatcatgtaaccgcttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacga  
cgagcgtgacaccacgatgctcgagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctgacttcccggcaaca  
attaatagactggatggaggcggataaagttgacggaccactctgcgctcggccctccggctggttattgctgataaatctggagc  
cggtagcgtggatctcgcggtatcattgagcactggggccagatggaagccctccgctatcgtagtattctacacgacggggagtcag  
gcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgctcactgattaagcattggtaa
```

> Gen *bla*_{OXA-51-like}

```
atgaacattaagcactcttacttataacaagcgctattttatttcagcctgctcaccttatatagtgactgctaatccaaatcacagcg  
cttcaaaatctgatgtaaagcagagaaaattaaaaatttatttaacgaagcacacactacgggtgttttagttatccaacaaggc  
caaactcaaaaagctatggaatgatcttgcctgctcagaccgagatgtacctgcttcgaccttcaaaatgcttaatgctttga  
tcggccttgagcaccataaaggcaaccaccacagaagtatttaagtgggatggtaaaaaagggtattcccagaatgggaaaag  
gacatgaccctagcgcgatgccatgaaagctccgctattccagttatcaagattagctcgtcgtattggactgagctcatgtct  
aaggaagtgaagcgtgttggtatggcaatgcagatattcgtaccgaagtcgataattttgctggtgggtcctttaaaaattact  
cctcagcaagaggcacagtttgcttacaagctagctaataaaacgcttccatttagccaaaagtcgaagatgaagtgcaatcc  
atgctattcatagaagaaaagaatgaaacaaaatatacgcgaaaagtggtgggatgggatgaaaccacaagtaggctggttaa  
ctggatgggtgttcagcctcaagggaatattgtagcgttctcccttaacttagaaaatgaaaaaaggaatacctagctcgttcgaaaagaga  
ttacttataaaagcctagaacaattaggtatttatag
```

>Gen *rpoB*

atggcatactcatataaccgaaaagaaacggatccgtaagaatggtaaattgccccaaagtaatggatgacccgactattatcgattcag
gtcgattctgacagaacattctgcaagatggcaaatcaccaaaaaacggaagatcggtctccaagccgattctggtcagttttcct
atcgaaagttattctggcaatgctgctttagaattgtgagtagccttgtaaacctgagttcgatgtacggaatgtattctcgtggctcga
cttatgcggcaccaatgcgcgtaaaattcgtttgattataaagatcgcgaaactaaatcaattaaagacgtacggaacaagaagtctat
atgggtgaaatccactcatgactgaaaatggtaccttggatcaacggtagctgagcgtgtaacgtatctcaattacaccgttcgccaggcgt
attcttgaccatgataaaggtaagaccactcaagtggtaaagtgtgtattcagcacgtatcattcctaccgtggttcatggttagacttca
attgatgcaaaagacttagttacgtatcgaccgtcgtgtaaattactgtacagttgtgtacgtgactaggtataaacaatgaaca
gatcttgaattgttctatgaaaaagtagctgtatcttgacatggtagctatcaaattgacctgtagctgagcgtttacgtggtgaaatggct
caattgatattactgacaatgaaggtaaagtcattgttgagcaaggtaaactgattatgctcgtcatgtacgcaaatggaagctcaggtt
taactaagcttcagttcctgatgaatactatagagcgtatcactgctgaagatattactctacgtgatggtgaagtaattgctgcaaaactct
gttaagccatgaagtaattggtgaagttggcagaagggtgttaagcaattataatctgttcactaacgatattgaccgtggttcattcgtag
ctgatacattacgtg**ctgacttgacgctgtagcgtgaagaagcattagtagaaatctacaaagtaatgcgtcaggcgagccacc**
aacaaaagaagctgctgaaaacttattcaataactgttcttctctgaacgctatgacttattcctcagtaggtcgtatgaagttca
accgtcgttttaggtcgtccttacgaagttggtactgatcagaagtcacggaagttgaaggtatctcgcacgaagatattatcg
atgtattacgtacattggttgaatccgtaacggtaaaaggtaagtcgacgatatcgaccacttaggtaaccgtcgtgtacgttct
gttgggtgaaatgacagagaaccaatccgtgtaggttagttcgtgtgagcgtgctgttaagagcgttaagccaagcagaaa
cagataactgtctccacaagatttgattaatgcaaaaccagttgctgctgcaatcaaa gaattcttggttcaagccagttatctca
gtttatggacaaaacaaccattatctgagattacacataaacgctggtatctgctgcttggtcctggtggttaacacgtgaacg
tgcaggctcgaagtagctgacgtacacaaactcactatggctggtttgcaattgaaactcctgaaggtccaaacattggtt
gatcaactcgttctgtatcgcaaaagcgaatgacttcggttcttgaaacaccataaccgcaaagttgtagatggtcgtgtaa
ctgatgatgttgaatatttctgcaattgaagaagtaggtactgtattgcacagccgactctgctgtagataaagatggcaactt
aacagaagaattcgttctgttcgtcatcaaggtaattcgtacgtatgccgcctgaaaaagtaacgcatatggacgttctgcac
agcaggtagtagtctgttgcgtcacttattcattccttgaacacgatgacgcaaacctgctggctcatgggtcaaca****tgcaa
cgtcaggcagttcctactttacgtgctgataaacgctgtaggtagcaggtatggaagcgaacgttgacgtgactctggtgtgtgtaac
gcaaacctggcggtgaattgaatgtagatgctctcgtatcgttattcgtgaaacgaagatgaaatggtgacaggtgagcaggtgta
gatataacatcaaaatatacgcgttcaaaccaaaaatactgtattaacaaaatgttatcgtgaactgggagcaaaagttgctcgtg
gtgacatctggcagacggtccgtcaacagacatgggtgaactgctgctgtgcaaaacatgctgtgtagcgttcatgacatggaatggttac
aactacgaagactcgtatctgtatctgagcgtgtactcaagaagaccgtttaaactctattcattcaagaattgcatgtgtagcagctga
tactaagttagggtcagaagaaactgcccgatctcaacgtaggtaagctgctgctttaaactgtgaaatcaggtatcgtttatctg
gtgctgaagttactgctggtgacatcttagttgtaagtaacgctaaaggtaaaactcgttaactcctgaagaaaaactgctcgtgcaa
ttttggtgagaaagcagctgacgttaagactcatcttaccgtgttccatctggtactaaaggtagcgttattgacgttcaagttcactcgtga
tggcttagagaaagatgaccgtgcttagcaattgaaaaagcacagcttgattctatcgtaaagactgaaagaagaatacaagatcttcg
aagaagcggctcgtgagcgtgtaattcgttggcttaaggccaagagtctaatggcgggttcaactaaacgtggtgataaactttctgaa
gatttattatctggttagagcttgtgacttactgaaatcaaccagcagatgaagcaatcgtgagcgtttaaactcaaatcaagttctgaa
aagagaagagcgcagaatcgatgagaaatcgtgagaagaaacgtaagcttgaacaggtgatgaattaacaactggtgtattgaa
agttgtaaaagttacttagctgttaaacgctgattcagcctggtgataagatggctggtcgtcacggtaacaaagggtgtgatctaactct
acctgtgaagacatgccacatgatgctaaccggtgtccggtagatcgtattgaaccgctggtgtaccatctcgtatgaacgtgggtca
gattctagagactcacttgggtatggcggctaaaggcctggtgacaaaatcgaaaaatgttgaaagaacaacgtacagttttagaactg
cgcgaattcttagacaagattataacaaagtcggcgggtgagcaagaagatcttgatagcttactgatgaagaaatctagcgttgcag
gtaactgctgctgggtgtgccttagctactcctgtattgtggtgctgaagaaagtaaaatgaagacttactgaattggtgacattcac
gtactggtcaaacagattgtttgacggacgtacaggtgaacagttgaccgtccagtaactgttggttacatgtacatgctaaattgaaZca
cttgggtgatgacaagatgcatgctgctcaactggttcttactcactgttacacaacaaccgcttgggtgaaagcacaattcgggtgctcag
cgttcgggtgagatggaagatgggactgaagcatacgggtgcagcatatacactccaagaaatgcttacagtgaaagtcggatgacgttg
aaggccgtactcgcactataagaatattgtagatggttaaccattatggatccgggtatgctgcaatcgttcaacgtattgaccaagaga
tccgttcttaggtatcaacattgaactaaaaaatggtgactaa