



**Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magister en Ciencias Mención Microbiología**

**CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE
CARBAPENEMASAS ADQUIRIDAS TIPO OXA EN CEPAS DE
Acinetobacter baumannii AISLADAS EN HOSPITALES
CHILENOS.**

POR PABLO SIMÓN ARAYA VEGA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar
al grado de Magister en Ciencias Mención en Microbiología

Profesor Guía de Tesis:

Dr. Andrés Opazo Capurro

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Julio, 2025

Concepción, Chile

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía de Tesis

- ❖ Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesores Integrantes de Comisión Evaluadora:

- ❖ Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción
- ❖ Dr. Alejandro Aguayo Reyes
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción

Evaluador Externo

- ❖ Dr. Santiago Castillo Ramírez
Centro de Ciencias Genómicas
Universidad Nacional Autónoma de México

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT Iniciación N°11190602.

ÍNDICE

FINANCIAMIENTO	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
RESUMEN	9
CAPÍTULO II: ANTECEDENTES GENERALES.....	16
La Resistencia antibiótica	16
One Health, One World.	19
La Organización mundial de la salud y los patógenos prioritarios	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	22
Mecanismos de resistencia a carbapenémicos.	28
Carbapenemasas: clasificación y distribución	30
Carbapenemasas en Latino América y el Caribe.....	37
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos (ABRC)	38
CAPITULO III: Elementos genéticos móviles y secuenciación del genoma completo	43
Transferencia horizontal de genes.....	43
Elementos genéticos móviles asociados a <i>A. baumannii</i> resistente a antibióticos.	46
Estudio y caracterización de plásmidos de <i>A. baumannii</i>	55
Secuenciación y reconstrucción de plásmidos	59
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL	62
Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
Hipótesis	62
Objetivo General	63
Objetivos Específicos	64
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y METODOS.....	65
Cepas de Estudio	65
Perfil de susceptibilidad	66

Extracción de ADN	67
Detección de carbapenemasas mediante PCR	67
Secuenciación del genoma completo	68
Ensamblaje del genoma	69
Análisis del genoma	69
Análisis de plásmidos	70
Identificación de plásmidos	71
Confirmación de genes de carbapenemasas	73
Análisis, anotación y visualización de plásmidos	73
Anotación de genes de plásmidos y visualización	73
Comparación con plásmidos circularizados	74
Ensayo de conjugación	75
Selección de cepas dadoras y receptoras	¡Error! Marcador no definido.
Selección de cepas receptoras mutantes resistentes a rifampicina	76
Ensayo de conjugación en medio líquido	76
Análisis de resultados de conjugación mediante ERIC-PCR y PCR	77
CAPÍTULO V: RESULTADOS	78
Perfiles de resistencia a los antibióticos	78
Identificación de genes carbapenemasas tipo OXA	79
Secuenciación del genoma completo y análisis de secuencias	79
Reconstrucción de plásmidos portadores de OXAad	81
Anotación y visualización de plásmidos	86
Plásmidos portadores de OXA-58 y replicasa R3-T14	87
Plásmidos portadores de OXA-23 y replicasa RP-T1	94
Selección de cepas mutantes de <i>A. baumannii</i> resistente a la rifampicina	101
Selección de cepas dadoras	103
Ensayo de conjugación.	103
CAPÍTULO VI: DISCUSION	106
Perfiles de resistencia y secuenciación	106
Reconstrucción y caracterización de plásmidos	110
Plásmidos <i>bla</i>_{OXA-23}/RP-T1	111

Plásmidos <i>bla</i>_{OXA-58}/R3-T14.....	114
Conjugación	118
CAPÍTULO VII: CONCLUSIÓN	121
CAPÍTULO VIII: AGRADECIMIENTOS	122
Anexo 1.....	¡Error! Marcador no definido.
Bibliografía.....	123
Anexos	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de la población de <i>A. baumannii</i>	42
Figura 2: Mecanismos de transferencia horizontal de genes.....	44
Figura 3: Elementos genéticos móviles (EGM) que contribuyen a la resistencia a los antibióticos en <i>A. baumannii</i>	47
Figura 4: Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las 32 cepas de <i>A. baumannii</i>	78
Figura 5: Árbol filogenético de las cepas de <i>A. baumannii</i> portadoras de OXA adquiridas (OXAad)..	81
Figura 6: Plásmido portador del gen blaOXA-58 de la cepa A375	87
Figura 7: Plásmido portador del gen bla _{oxa-58} de la cepa A462	88
Figura 8: Plásmido portador del gen bla _{oxa-58} de la cepa A658	89
Figura 9: Plásmido portador del gen bla _{oxa-58} de la cepa A758	90
Figura 10: Plásmido portador del gen bla _{OXA-58} de la cepa A891	91
Figura 11 Plásmido portador del gen bla _{OXA-58} de la cepa A892	92
Figura 12: Comparación de plásmidos portadores de OXA-58	93
Figura 13: Plásmido portador del gen bla _{OXA-23} de la cepa A356	94
Figura 14: Plásmido portador del gen bla _{OXA-23} de la cepa A872.	95
Figura 15: Plásmido portador del gen bla _{OXA-23} de la cepa A903	96
Figura 16: Plásmido portador del gen bla _{OXA-23} de la cepa A904	97
Figura 17: Plásmido portador del gen bla _{OXA-23} de la cepa A914	98
Figura 18: Plásmido portador del gen bla _{oxa-23} de la cepa A917	99
Figura 19: Comparación plásmidos portadores de OXA-23..	100
Figura 20: Gel de agarosa de PCR múltiple para detección de OXA Adquirida	104
Figura 21: ERIC-PCR de cepas seleccionadas.....	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de proteínas Tra	53
Tabla 2: Genes de resistencia a los antibióticos pesquisados a partir de las secuencias de los genomas completos de las cepas de estudio.....	80
Tabla 3: Plásmidos presentes en las cepas secuenciadas.....	83
Tabla 4: Genes relevantes presentes en los plásmidos OXA-58/R3-T14.....	84
Tabla 5: Genes relevantes presentes en los plásmidos OXA-23/RP-T1	85
Tabla 6: Selección de cepas receptoras mutantes resistentes a rifampicina	102
Tabla 7: CMI a rifampicina de cepas dadoras	103

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es actualmente uno de los problemas más importantes para la salud humana y animal, en donde según lo publicado por *The Lancet* el 19 de enero del año 2022, se atribuyen 1.2 millones de muertes directamente relacionadas con la resistencia a antibióticos a nivel mundial, lo cual reafirma las proyecciones que estiman que este valor alcanzaría las 10 millones de muertes al año 2050 asociadas a bacterias resistentes, si es que no se aplican medidas para su control. Además, es importante considerar el elevado costo económico asociado a la resistencia a antibióticos, argumentos con los que la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos resistentes a antibióticos para favorecer tanto la investigación y el desarrollo de nuevas terapias antibióticas, así como también para promover la investigación sobre estos microorganismos. La lista de la OMS clasifica a los patógenos bacterianos resistentes en 3 categorías según su impacto en la salud humana, en donde la prioridad crítica incluye a *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, y a especies de *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y resistentes a los carbapenémicos. Los carbapenémicos son antibióticos de gran importancia, ya que son considerados como última alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias multirresistentes, por lo que las cepas resistentes a estos son un problema para la salud pública ya que limitan las alternativas de tratamiento, por ejemplo, una de las opciones disponibles corresponde a antibióticos del grupo de las polimixinas (p.ej. colistín), el cual lamentablemente se asocia a neuro y nefrotoxicidad.

A. baumannii es uno de los principales microorganismos patógenos involucrados en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), siendo aislado frecuentemente en centros de atención hospitalaria. Este microorganismo presenta una gran plasticidad genética, lo que le permite adquirir diferentes genes de resistencia a través de diversos procesos de transferencia horizontal de genes, los cuales son mecanismos asociados generalmente a elementos genéticos móviles capaces de mediar la diseminación de dichos genes tanto inter e intra-especies.

La resistencia a carbapenémicos y su diseminación significan un gran problema, en donde microorganismos como *A. baumannii* representan un gran desafío para la salud humana y animal. En esta especie bacteriana se ha evidenciado una gran diseminación de determinantes resistencia a antibióticos carbapenémicos, específicamente mecanismos enzimáticos capaces de hidrolizar estas drogas, los que, a su vez, se asocian elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones y secuencias de inserción.

Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue establecer cuáles son los principales plásmidos asociados a carbapenemasas presentes en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos, y determinar su capacidad de diseminación. La estrategia para lograr cumplir con el objetivo anteriormente planteado consistió en el estudio de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos mediante técnicas de microbiología básica, biología molecular, secuenciación del genoma completo y análisis bioinformáticos.

Los principales hallazgos de este trabajo tienen relación con la caracterización de dos tipos de plásmidos portadores de diferentes genes de carbapenemasas tipo oxacilinasas, específicamente *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58}, que se relacionaron con plásmidos del tipo RP-T1 y R3-T14 respectivamente, según la clasificación de plásmidos de *Acinetobacter* (Lam et al., 2023). Por un lado, plásmidos del tipo RP-T1 clasificados como conjugativos y de un tamaño aproximados de 78kpb y por el otro, plásmidos del tipo R3-T14 resultaron ser plásmidos movilizables de un tamaño aproximado de 19kpb, siendo estos los responsables de la diseminación de genes de carbapenemasas en cepas de *A. baumannii*, que además son portadores de genes de virulencia, específicamente TonB, relacionado con adherencia celular y posiblemente relacionado con los procesos infecciosos causados por estas cepas. Finalmente, los plásmidos caracterizados en este trabajo están altamente relacionados a secuenciotipos (STs) específicos, como ST162 y ST318, los cuales corresponden a STs con alta incidencia en Latinoamérica, por lo que esta información aporta a la generación de una línea base de las características de estos STs y permitiéndonos entender de mejor manera las dinámicas de la diseminación de resistencia en este patógeno bacteriano de relevancia crítica.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se ha evidenciado el aumento de la incidencia de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, tales como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* sp. que conforman el grupo de patógenos ESKAPE, los que representan un gran desafío para la salud pública. Esta crisis tiene diversas causas, en donde se puede mencionar el uso irracional de los antibióticos en medicina humana, agrícola y producción animal (Allen et al., 2010). También cabe mencionar que este problema tiene un gran componente evolutivo, en donde el uso sostenido de antibióticos a través del tiempo ha ejercido una presión selectiva, la cual ha provocado la selección de bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos. Si a lo anterior se le adiciona la escasez de nuevas moléculas con actividad antibacteriana que presenten un mecanismo de acción diferente a los ya existentes y que, además, sean activos frente a estos microorganismos, nos plantea un escenario en el cual es posible encontrar infecciones provocadas por bacterias para las cuales no existan tratamientos efectivos disponibles en la actualidad (WHO/OMS, 2017).

Por otro lado, el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Abc) compuesto por 6 especies: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. seifertii* además de una nueva especie altamente relacionada, *A. lactucae*, también conocida como *A. dijkshoorniae* (Cosgaya et al., 2016; Nemec et al., 2017.). Dentro de este complejo, la especie de mayor impacto en el ámbito clínico corresponde a *A. baumannii*, la cual se relaciona principalmente con IAAS, siendo el cuarto patógeno aislado con mayor frecuencia en cuadros de neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) en Chile, con valores de susceptibilidad a los antibióticos carbapenémicos

imipenem y meropenem de 50.0% y 44,9% ,respectivamente, según el informe de vigilancia de IAAS del Ministerio de Salud de Chile (Ministerio de Salud de Chile, 2020).

La resistencia a antibióticos en esta especie es de gran relevancia, en donde existen 3 clasificaciones de acuerdo con el número de antibióticos a los cuales son resistentes, para la cual se consideran 11 grupos de antibióticos: ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, ceftazidima o cefepime, imipenem o meropenem, gentamicina, amikacina, ciprofloxacino, trimetoprima-sulfametoxazol, minociclina, tigeciclina y colistín. A partir de lo anterior, es que las cepas de *A. baumannii* se pueden clasificar en MDR (del inglés *multidrug-resistance*) para aquellas cepas que son resistentes a 3 de los 11 grupos de antibióticos; XDR (del inglés *extensively drug-resistance*) para aquellas que presenten resistencia a 9 o 10 de los 11 grupos; y en PDR (del inglés *pandrug-resistance*) para aquellas que sean resistentes a todos los grupos de antibióticos (M. A Jiménez Pearson et al., 2019) . Los aislados clínicos de *A. baumannii* son de gran importancia ya que un alto porcentaje presenta un fenotipo MDR, en donde los carbapenémicos representan a la última línea para el tratamiento de infecciones causadas por dichas cepas, por lo que existen limitadas opciones para el tratamiento de aquellas cepas que son resistentes a estos (M. A. Jiménez Pearson et al., 2019; Papst et al., 2018).

Al respecto, se han descrito diversos mecanismos de resistencia a los carbapenémicos en bacterias de implicancia clínica, en donde en el caso de *A. baumannii* predomina la expresión de enzimas capaces de hidrolizar dichas drogas, denominadas como carbapenemasas (Vázquez-López et al., 2020). Específicamente, las carbapenemasas de mayor predominancia corresponden a las del tipo OXA, las que corresponden a enzimas de la clase D según la clasificación de Ambler, siendo las más relevantes las familias OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 (Evans & Amyes, 2014), en donde se ha añadido recientemente la familia OXA 235. Estas enzimas son consideradas

como adquiridas, a diferencia de aquellas de la familia de OXA-51, la cual es definida como intrínseca en *A. baumannii*, la que al ser sobre expresada mediante la acción principalmente de la secuencia de inserción IS*Aba1*, es capaz de otorgar resistencia a carbapenémicos (Ambrose et al., 2022).

Esta especie bacteriana presenta una gran variabilidad genética, caracterizada por su capacidad de adquirir genes, en donde, además *A. baumannii* presenta una expansión clonal, en la cual ciertos linajes con más determinantes de resistencia a antibióticos predominan a nivel global, los que corresponden a complejos clonales (CC) o clones internacionales (IC, del inglés *International Clones*) I, II y III (Hamidian & Nigro, 2019). A pesar de lo anterior, en Chile y Latinoamérica los estudios de epidemiología de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos son escasos, en donde se ha demostrado que los aislados encontrados en la región pertenecen a linajes que difieren de los IC prevalentes, siendo los predominantes los IC-4, IC-5 y IC-6, los cuales corresponden a cepas de complejos clonales CC15 y CC79 y CC78 según el esquema *multilocus sequence typing* (MLST) del Instituto Pasteur. Algunos de los estudios relacionados con epidemiología molecular de esta especie es el reciente trabajo de Müller et al, donde analizaron 313 genomas de *A. baumannii* provenientes de 114 centros de estudios correspondiente a 47 países teniendo una distribución proporcional a la población de estos, siendo el IC2 el más prevalente con 196 aislados (62.6%) distribuidas mundialmente, seguido por el IC5 con 44 aislados (14.1%) provenientes principalmente de Latinoamérica (Müller et al., 2023). Importantemente, en este trabajo no se incluyeron cepas de Chile, en donde la epidemiología de *A. baumannii* en el país se ve subrepresentada por países con mayor número de aislados, como es el caso de aquellas provenientes de Brasil, en donde predomina la presencia de aislados pertenecientes al ST79^{pas} (IC5). Sin embargo, algunos estudios locales han demostrado la presencia de cepas pertenecientes mayoritariamente al ST15^{pas} y ST318^{pas} (IC4), asociado a la

presencia de carbapenemasas de las familias de *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} y *bla*_{OXA-72}, además del arreglo genético cromosomal *ISAba1-bla*_{OXA-51-like} (Fonseca et al., 2020; Müller et al., 2023; Opazo-Capurro et al., 2019; Rodríguez et al., 2016)). Adicionalmente, la variabilidad genética de *A. baumannii* se relaciona a su gran plasticidad genética, lo que implica la capacidad de adquirir material genético exógeno el cual puede presentarse en diferentes estructuras, también denominados como elementos genéticos móviles (EGMs), los cuales cumplen un importante rol en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Si bien existen estudios que relacionan la presencia de ciertos EGMs con determinados IC de predominancia global, en Latinoamérica estos estudios son escasos e insuficientes para explicar las dinámicas de diseminación de genes de resistencias en aislados de *A. baumannii* (Adams et al., 2010; Cerezales et al., 2020).

Considerando lo anteriormente descrito, es que el enfoque de este trabajo de tesis busca caracterizar los elementos genéticos móviles, específicamente plásmidos, que están involucrados en la distribución de resistencia a carbapenémicos en cepas de *A. baumannii* aisladas en hospitales chilenos.

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES GENERALES

La Resistencia antibiótica

La resistencia a los antimicrobianos (RAM), se define como la capacidad de microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) de sobrevivir a la presencia de un antimicrobiano en concentraciones terapéuticamente relevantes, lo que ocurre como un proceso evolutivo que responde a la exposición constante a dicho antimicrobiano (Center for Disease Control and Prevention, 2022). Las características de resistencia antibacteriana provocan la pérdida de actividad de varias moléculas antimicrobianas lo que dificulta el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes, por lo que la RAM se considera uno de los grandes desafíos para la salud pública mundial (OMS, 2020a). Este fenómeno se ve influenciado por el insuficiente desarrollo de nuevos antibióticos, reducido drásticamente en los últimos años, y por otro, por el uso y mal uso de antimicrobianos, donde las bacterias han resistido a la actividad de los antibióticos. (OPS/OMS, 2020 OMS, 2020)

La RAM se ha posicionado como una de las grandes amenazas para la salud tanto humana como animal en el siglo XXI, en donde en el año 2014 el gobierno británico encomendó al economista Lord Jim O'Neill que elaborara un informe sobre el impacto de este fenómeno, el cual proyecta que las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos darán cuenta de cerca de diez millones de muertes para el año 2050 si no se toman medidas, en donde se convertirá en la primera causa de muerte a nivel global,

lo que además producirá un gran impacto económico a nivel global, afectando de mayor manera a los países más pobres (O'Neill, 2016). Esta problemática se disemina muy rápidamente, ya que estas bacterias al estar relacionadas con personas, animales, plantas, alimentos y el medioambiente, favorece la aparición y diseminación de resistencia, mediada por el uso y sobre uso de antimicrobianos, así como también influenciada por el acceso a agua limpia, la higiene y sanitización de animales y humanos, la poca prevención y control de enfermedades en unidades de cuidado, el acceso a medicamentos, vacunas y diagnóstico, el desconocimiento de la población y el insuficiente esfuerzo legislativo al respecto (WHO, 2021) (Prestinaci et al., 2015). Así, en estos últimos años se han hecho estudios sistemáticos para comprender sobre el impacto real de la resistencia a antibióticos. En este contexto, en un trabajo publicado recientemente en *The Lancet* el año 2022, confirma lo proyectado por O'Neill hasta la fecha, se estimaron 4,95 millones de muertes asociadas con la resistencia antibacteriana a nivel global durante el 2019 y en donde 1,27 millones son atribuibles a bacterias resistentes a los antibióticos, destacando 6 patógenos : *Escherichia coli*, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Murray et al., 2022). Estos datos posicionan actualmente a las infecciones causadas por bacterias resistentes como la principal causa de muertes en países de bajos ingresos, siendo de suma importancia para el manejo de esta crisis el entendimiento del impacto de esta misma, dando prioridad al estudio de la combinación patógeno-antibiótico, en donde destacan: *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación, *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, y *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación (Temkin et al., 2018). Sin embargo, estas cifras pueden estar subestimadas debido a la falta de información en muchos países de bajos ingresos (Murray et al., 2022). Es por ello que la implementación de programas para la correcta administración y manejo de antibióticos es una piedra

angular en el combate contra la resistencia antibacteriana (Cox et al., 2017).

Para afrontar esta crisis, la OMS y numerosos grupos de investigadores y organizaciones concuerdan en que la resistencia antibacteriana es un problema global de suma urgencia en donde se requiere de un plan de acción coordinado y multisectorial. En este sentido, una de las primeras acciones a nivel mundial sustentada con la gran cantidad de información que posiciona a la RAM como un problema grave para la salud humana ocurre el año 2017, específicamente con la publicación de la lista de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, la que incluye diferentes especies bacterianas y en las cuales se han pesquisado mecanismos de resistencia a antibióticos importantes para su tratamiento y las cuales están relacionadas con una elevada mortalidad, dicha lista incluía 11 especies bacterianas y un grupo bacteriano (Tacconelli et al., 2017). Recientemente, esta lista ha sido actualizada y presentada como lista de prioridad de patógenos bacterianos (BPPL 2024). Estos patógenos son considerados como una importante amenaza para la salud humana debido a las infecciones que causan y la poca efectividad de antibióticos contra ellos, en donde esta lista busca incentivar el estudio de los mecanismos de resistencia, así como la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos para lidiar con estos patógenos (WHO/OMS, 2017; World Health Organization, 2024)

One Health - One World.

Si bien la RAM representa un gran impacto en la salud humana, es importante considerar múltiples aspectos involucrados en este fenómeno, siendo el medio ambiente y la salud animal igual de importantes que la salud humana. En este sentido, la visión *One Health* considera estos tres escenarios para afrontar la problemática de la RAM, la cual requiere una visión multidisciplinaria, multisectorial y coordinada para afrontar esta crisis (Robinson et al., 2016). El escenario que plantea esta visión se centra en el hecho de que la aparición de la resistencia antibacteriana resulta en la confluencia de hospederos colonizados (humanos y animales) por bacterias y estos a su vez comparten un medioambiente en el cual existen bacterias portadores de genes de resistencia a antibióticos que podrían movilizarse entre las bacterias existentes en cada uno de estos componentes, en donde los elementos genéticos móviles tendrían un rol fundamental en la diseminación de la resistencia (Hernando-Amado et al., 2019).

En un contexto global, el enfoque *One Health* funciona como una estrategia de estudio local, es decir, en un lugar geográfico acotado, en donde el siguiente nivel de esta perspectiva corresponde al enfoque denominado *One World*, concepto que integra además la epidemiología molecular para el entendimiento de las relaciones genéticas y la evolución de la RAM en patógenos o vectores, humanos, animales y a nivel medioambiental (Hernando-Amado et al., 2019). Esta perspectiva también está nutrida de factores socioeconómicos, así como del desplazamiento tanto de humanos como la migración animal, el cambio climático y la globalización, en donde todos estos aspectos inciden en la diseminación de la resistencia antibiótica (Aslam et al., 2021; Hernando-Amado et al., 2019).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y los patógenos prioritarios

“Nuevos antibióticos dirigidos a esta lista de patógenos prioritarios ayudaran a reducir las muertes por infecciones causadas por bacterias resistentes en todo el mundo” señala la Dra. Evelina Tacconelli (Organización Mundial de la Salud, 2017), quien es una de las principales investigadoras involucrada en el diseño de la lista de patógenos prioritarios de la OMS del año 2017. En esta lista, se utilizaron como criterios: la mortalidad de las infecciones que causadas por estos microorganismos, el tiempo de hospitalización que requieren los pacientes afectados, la frecuencia de que estas bacterias sean resistentes a los antibióticos, que tan rápido se diseminan entre animales y de animales a humanos, y entre personas, como pueden ser prevenidas, cuantas opciones terapéuticas existen y que nuevos antibióticos están siendo estudiados para lidiar con estas infecciones (Tacconelli et al., 2018). Recientemente esta lista ha sido actualizada y denominada como BPPL 2024, en las cuales se consideran las características actuales de los parámetros evaluados en su primera versión, siendo uno de los parámetros más importantes la mortalidad asociada a procesos infecciosos causados por estos patógenos bacterianos y los tratamientos existentes en la actualidad para poder lidiar con estas infecciones. Es así que en su versión 2024 esta lista incluye 15 familias de patógenos bacterianos normalmente muy resistentes a antibióticos, clasificándolos en tres grupos de prioridad: crítico, elevado y medio (WHO/OMS, 2017; World Health Organization, 2024):

Prioridad Crítica:

- Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenémicos.
- Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos y productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs).
- Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de 3ra generación.
- Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina.

Prioridad Elevada:

- Salmonella* Typhi resistentes a fluoroquinolonas.
- Shigella* spp., resistente a fluoroquinolonas.
- Enterococcus faecium*, resistente a vancomicina.
- Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenémicos.
- Salmonella* no tifoidea, resistente a fluoroquinolonas.
- Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas, resistente a fluoroquinolonas.
- Staphylococcus aureus*, meticilino-resistente.

Prioridad Media:

- Streptococcus* grupo A, resistente a los macrólidos.
- Streptococcus pneumoniae*, resistente a los macrólidos.
- Haemophilus influenzae*, resistente a ampicilina.
- Streptococcus* grupo B, resistente a penicilina.

Esta lista se establece como una nueva herramienta que busca promover el estudio y el desarrollo de nuevas terapias antibióticas para estas bacterias (WHO/OMS, 2017). Los aislados con las características de resistencias mencionadas en esta lista marcan una línea a seguir, y en este contexto, las especies bacterianas pertenecientes a la categoría de “prioridad crítica” son de gran relevancia específicamente por la resistencia a carbapenémicos, ya que las alternativas terapéuticas para tratar las infecciones causadas por estas son escasas, lo que significa que poseen una alta morbi-mortalidad (Tacconelli et al., 2018; World Health Organization, 2024).

Acinetobacter baumannii

Las especies del género *Acinetobacter* se caracterizan por ser de cocobacilos pleomórficos, Gram negativas, aerobias estrictas, productores de catalasa, y oxidasa negativa (T. Wang et al., 2019). Son especies no fermentadoras de azúcares e inmóviles, en donde su taxonomía está siendo constantemente actualizada desde el principio del siglo XX (Howard et al., 2012). Es así que en los años 1980s y en respuesta al amplio reconocimiento y aparición de patógenos intrahospitalarios del grupo de *Acinetobacter*, es que se ha realizado el estudio en profundidad de su taxonomía, en donde en sus inicios, la clasificación de este grupo se basó en la hibridación ADN-ADN, generando 12 grupos o genoespecies, las que corresponden a *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii* y *Acinetobacter lwoffii* (Vijayakumar et al., 2019). En particular, el complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (complejo ABC) comprende 4 especies originalmente: *A. calcoaceticus* (genoespecie 1), *A. baumannii* (genoespecie 2), *A. pittii* (genoespecie 3) y

A. nosocomialis (genoespecie 13) (Gerner-Smidt, 1992), siendo todas ellas altamente relacionadas, lo que las hace difíciles de distinguir fenotípicamente. Recientemente, se añadieron 2 nuevas especies al complejo, las que corresponden a *Acinetobacter seifertii* y *Acinetobacter lactucae*. Es así como en la actualidad el complejo comprende 5 especies de relevancia clínica humana (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* y *A. lactucae*) y una especie considerada ambiental (*A. calcoaceticus*) (Nemec et al., 2015)(Cosgaya et al., 2016).

Tal como se mencionó anteriormente, la identificación de las especies del complejo ABC presentan diversas complicaciones y desafíos, en donde los métodos fenotípicos clásicos como la temperatura de crecimiento, hemólisis, metabolismo de glucosa, y las fuentes de carbono/energía, ya sea de manera convencional o en sistemas automatizados, no son capaces de diferenciarlas (Li et al., 2017). Además de estos métodos fenotípicos, con el paso del tiempo se han implementado diferentes metodologías de identificación molecular, tales como la hibridación ADN-ADN (Tjernberg & Ursing, 1989) y la secuenciación del gen 16S rARN (Abubakar et al., 2005), en donde los laboratorios clínicos han además incorporado la tecnología de ionización/desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés MALDI-TOF) para su identificación (Šedo et al., 2013). En el área de la investigación y el estudio epidemiológico, otra técnica que cobra gran relevancia para el estudio del complejo ABC es la secuenciación de genomas completos, la cual poseen una mayor resolución para diferenciar las especies pertenecientes al complejo (Fitzpatrick et al., 2016; Rafei et al., 2019). Uno de los biomarcadores que permite la identificación de la especie *A. baumannii* es el gen *bla*_{oxa-51-like}, el cual está ubicado en el cromosoma de esta especie, teniendo un poder de hidrólisis muy débil frente a carbapenémicos (Evans & Amyes, 2014). Es así como la utilidad de la detección de este gen diferenciador de *A. baumannii* dentro del complejo ABC fue establecido por Turton et al. siendo de gran utilidad, ya que mediante

técnicas simples de PCR podemos identificar a esta especie tan relevante (Turton, Woodford, et al., 2006). Sin embargo, se han reportado casos de especies de *Acinetobacter* no *baumannii* portadoras del gen *bla*_{OXA-51-like} (Lee et al., 2012) lo que ha desestimado su uso como única prueba de identificación. Sin embargo, en la actualidad se han propuesto otras metodologías que permiten diferenciar *A. baumannii* de las otras especies pertenecientes al complejo ABC, como lo es identificación basada en la amplificación mediante PCR de una región intergénica (ITS) entre los genes de las regiones 16S y 23S de ARNr (Chen et al., 2007)

Como se ha mencionado anteriormente, el género *Acinetobacter* incluye tanto especies ambientales como especies que son patógenas de humanos y animales. En este último grupo, aquellas especies de mayor importancia en salud humana corresponden a *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. baumannii*, siendo esta última la más relevante epidemiológicamente, la cual se aísla frecuentemente en unidades de cuidado intensivo (UCIs) vinculadas a infecciones importantes, como neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM), bacteriemias, infecciones de tracto urinario (ITU), meningitis e infecciones de heridas (Wong et al., 2016). La incidencia de *A. baumannii* en el contexto hospitalario es mucho mayor que las otras especies integrantes del complejo ABC, (Mancilla-Rojano et al., 2020). En este sentido, según informa el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) del 2019, los aislados resistentes a carbapenémicos de *A. baumannii* son responsables de casi 8500 casos de hospitalización de pacientes el 2017 en Estados Unidos, en donde se estima que estas son responsables de 700 muertes ese mismo año (Centers for Disease Control, 2019). En Chile, según informa el Ministerio de Salud el año 2019, de casi 90 casos de IAAS causadas por cepas del género *Acinetobacter*, 87 de estas se identificaron como *A. baumannii*, incluyendo otras especies correspondientes a *A. junii*, *A. pittii* y una cepa identificada como *Acinetobacter* spp. Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) causadas por *A. baumannii* descritas

en este informe corresponden principalmente NAVM, bacteriemias e ITU (Ministerio de Salud de Chile, 2020).

Las características que posicionan a *A. baumannii* como un patógeno de relevancia son: su extenso repertorio de genes de resistencia a antibióticos y agentes desinfectantes, su capacidad de resistir a diversas condiciones ambientales y la presencia de factores de virulencia, siendo un verdadero desafío en el contexto clínico (Cerqueira & Peleg, 2011) pudiendo ser transmitida entre pacientes debido a su persistencia en este ambiente, específicamente en superficies, así como también a su capacidad de colonizar las manos de trabajadores del área de la salud (Spellberg & Bonomo, 2013; Wong et al., 2016). Además, es importante considerar su gran capacidad de adaptación, ya que se considera una especie naturalmente competente, lo que le permite la captura de una gran variedad de genes de resistencia a antibióticos a lo largo del tiempo, los cuales pueden ser transportados por diferentes elementos genéticos móviles tales como transposones, integrones y plásmidos (Domingues et al., 2012).

Los factores de virulencia de *A. baumannii* generalmente han sido menos estudiados que sus mecanismos de resistencia a antibióticos, sin embargo, en los últimos años, con el uso de la genómica, estudios fenotípicos y la utilización de modelos *in vivo* de infección, ha sido posible generar un mayor entendimiento del rol que juegan los factores de virulencia en la patogénesis de las infecciones causadas por esta bacteria, siendo una vez más su gran variabilidad genética la responsable de dotar a los diferentes clones de *A. baumannii* de herramientas para comportarse como un patógeno de importancia clínica (Antunes L. et al., 2014). Dentro de los factores de virulencia que más se han estudiado y se ha demostrado su implicancia en la patogénesis se encuentran las proteínas de membrana externa (OMP, del inglés *outer membrane protein*), tales como las porinas, las que en bacterias Gram negativas tienen un rol importante en la interacción

con el entorno extracelular, jugando un papel clave en la virulencia (Lin et al., 2002). Dentro de las OMP en *A. baumannii*, destaca la porina OmpA, la que se relaciona con invasión celular y apoptosis; además de su función como porina, esta proteína tiene la capacidad de inducir la formación de biopelículas, así como también se ha relacionado con la diseminación de *A. baumannii* en el torrente sanguíneo, y con la interacción con células epiteliales, uniéndose a la fibronectina (Choi et al., 2005; Smani et al., 2012)

Otro factor de virulencia de *A. baumannii* que se ha estudiado es su envoltura, tanto el lipooligosacárido (LOS) y la cápsula, siendo factores de suma importancia los que juegan roles claves en el proceso de infección, en donde el LOS es un importante factor de resistencia frente al suero humano, provocando también una respuesta proinflamatoria (Knapp et al., 2005).

En la capa más externa extracelular, se encuentra la cápsula, la cual es un determinante de virulencia que rodea a la célula bacteriana. Esta estructura está constituida por diversas unidades de azúcares los que generan una barrera protectora contra el ambiente, evitando la deshidratación y confiriendo resistencia a agentes desinfectantes. Sin embargo, un importante rol de la cápsula corresponde a la evasión de la respuesta inmune del hospedero infectado, específicamente, contra el proceso de fagocitosis y contra ciertos antibióticos, en donde esta estructura es muy variable con respecto a su conformación, existiendo más de 100 variantes para este factor de virulencia (Geisinger et al., 2015; Kenyon & Hall, 2013; Mussi et al., 2019)

Además de los factores mencionados anteriormente, existen algunos factores de virulencia que han sido recientemente estudiados, tales como los son los sistemas de secreción, en donde el sistema de secreción tipo 2 (T2SS) participaría en la excreción de lipasas y endopeptidasas, como CpaA, las que son capaces de degradar el fibrinógeno,

favoreciendo el proceso infeccioso (Sandkvist, 2001; Tilley et al., 2014). Adicionalmente, se ha descrito otro sistema de secreción en *A. baumannii*, el sistema de secreción tipo 6 (T6SS), el cual es un sistema capaz de secretar proteínas o toxinas a otras células bacterianas, cuyo proceso es mediado por contacto entre bacterias, otorgando ventajas competitivas en infecciones polimicrobianas y específicamente en infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Elhosseiny & Attia, 2018; Repizo, 2017)

Es así como todas estas características favorecen a la persistencia de *A. baumannii* en hospitales y centros de salud, específicamente en las UCIs, en donde pueden afectar a pacientes con compromisos sistémicos importantes, como en el caso de pacientes afectados por COVID-19 (Boral et al.; Zeighami et al., 2019).

Si bien la virulencia de *A. baumannii* es un factor relevante, una de sus principales características es su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, en donde se han descrito los mecanismos tales como: i) alteración del sitio blanco relacionado con resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, oxazolidinonas, aminoglucósidos y rifampicina; ii) la alteración de la permeabilidad de la membrana relacionado con resistencia a aminoglucósidos betalactámicos, macrólidos, lincosamidas, polimixinas, tetraciclinas, fluoroquinolonas, rifampicinas, cloranfenicol, sulfonamidas, entre otros y finalmente iii) mecanismos de degradación o modificación enzimática del antibiótico, relacionado con resistencia a antibióticos como, tetraciclinas, β -lactámicos, fluoroquinolonas, fosfomicina, rifampicinas, sulfonamidas, aminoglucósidos, cloranfenicol y macrólidos (Kyriakidis et al., 2021). Los mecanismos antes descritos son definidos como adquiridos, sin embargo también existen características intrínsecas de esta especie bacteriana que se pueden relacionar con resistencia a algunos antibióticos, como lo son algunos factores de virulencia, tales como la envoltura bacteriana asociada a la presencia de LOS y/o la cápsula, así como también

es importante el rol de las OMPs, como las porinas y algunos reguladores de la formación de biopelículas, entre otros, permitiendo generar resistencia a compuestos antibacterianos (Kyriakidis et al., 2021). La suma de todos estos factores genera como consecuencia que un alto porcentaje de los aislados de *A. baumannii* presenten un fenotipo multirresistente, ya sea MDR, XDR o PDR (. Jiménez Pearson et al., 2019).

Mecanismos de resistencia a carbapenémicos.

Para comprender el mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos, tal como los carbapenémicos, es necesario entender cómo se sintetiza el peptidoglicán (PG) y la importancia de las enzimas que participan en este proceso. En términos generales, la síntesis del PG consta de 4 etapas: en la primera, tiene que ver con la síntesis de precursores a nivel intracelular, siendo la glucosamina enzimáticamente convertida en ácido acetilmuránico (MurNAc), luego este al reaccionar con uridina trifosfato (UTP) producen ácido N-acetilmurámico uridina difosfato (UDP-MurNAc), siendo esta la molécula precursora del pentapéptido, el que será ensamblado en una serie de pasos enzimáticos (Murray et al., 2016). En una segunda etapa, el pentapéptido unido al UDP-MurNAc es unido al bactoprenol en la cara citoplasmática de la membrana celular, siendo este un tipo de transportador, en donde los precursores se unen mediante un enlace pirofosfato con lo que libera una molécula de uridina monofosfato (UMP). Luego, una molécula de N-acetilglucosamida (GlcNAc) se adiciona para formar un disacárido. En una tercera etapa, el bactoprenol transloca el precursor disacárido hacia la cara externa de la membrana celular, para finalmente en una última etapa generar la extensión y el entrecruzamiento del PG en donde el disacárido GlcNAc-MurNAc es anclado a una cadena de PG usando enlaces pirofosfatos mediados por enzimas llamadas

transglicosilasas. Luego, las cadenas peptídicas son adicionadas a las cadenas de disacáridos y unidas mediante un enlace péptido mediante transpeptidación, en donde este proceso es catalizado por transpeptidasas o también llamadas proteínas de unión a penicilina o por sus siglas en ingles PBPs, ya que son el blanco para antibióticos β -lactámicos, interviniendo en la transpeptidación y evitando el crecimiento y la división celular (Murray et al., 2016).

Los antibióticos carbapenémicos, principalmente representados por meropenem e imipenem, pertenecen a los antibióticos β -lactámicos mencionados anteriormente, en este grupo se incluyen además antibióticos como las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, los que se caracterizan por presentar un anillo β -lactámico como parte de su estructura molecular (Papp-Wallace et al., 2011). Los antibióticos β -lactámicos son los antibióticos más utilizados a nivel mundial (Centers for Disease Control and Prevention, 2021), siendo los carbapenémicos considerados como la última línea en el tratamiento de infecciones complicadas, y siendo una de las principales terapias para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes como lo son *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacterales* (Codjoe & Donkor, 2017; Doi, 2019)

La resistencia a los carbapenémicos puede estar mediada por diversos mecanismos, tales como la alteración de la permeabilidad debido a la disminución de la expresión de porinas de la membrana externa, lo cual impide que los antibióticos alcancen sus sitios de acción (King et al., 2017). Un ejemplo de este tipo de resistencia a carbapenémicos se ha documentado en *P. aeruginosa*, la que presenta elevada resistencia a diversos antibióticos mediada por este tipo de mecanismo. Otro mecanismo de resistencia a carbapenémicos es la sobreexpresión de bombas de expulsión, siendo un mecanismo que se basa en la remoción de los antibióticos de la célula antes que lleguen a tener efecto, teniendo gran importancia en bacterias como *P. aeruginosa*

(Elshamy et al., 2019.; King et al., 2017). La sobreexpresión de estas bombas puede generar resistencia a múltiples antibióticos, ya que existen bombas que expulsan una gran variedad de antibióticos de manera no selectiva. Los sistemas de bombas de expulsión, específicamente sus genes no son comúnmente transmitidos por elementos genéticos móviles, siendo descritos solo algunos plásmidos portadores de genes de este tipo en los últimos años. (Aurilio et al., 2022; Elshamy & Aboshanab, 2020).

Carbapenemasas: clasificación y distribución.

El mecanismo de resistencia a carbapenémicos de mayor importancia en *A. baumannii* es la expresión de enzimas del tipo carbapenemasas (Castanheira et al., 2023; Poirel & Nordmann, 2006). Estas enzimas originalmente han sido descritas en bacterias como *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis* (Carfi et al., 1995; Duval et al., 2003), las cuales, a diferencia de otras β -lactamasas descritas, son inhibidas por EDTA (Queenan & Bush, 2007). A partir de su primera descripción, se han reportado múltiples casos de carbapenemasas en otras familias de bacterias, tales como en *Enterobacteriaceae*, reportándose una enzima capaz de hidrolizar imipenem que estaba codificada a nivel cromosomal tanto en *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae* (Nordmann et al., 1993; Yang et al., 1990).

Recientemente, se ha documentado la distribución de carbapenemasas es un fenómeno global, en donde en el año 2001 se identificó la enzima carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* o KPC, descrita en aislados de *K. pneumoniae* en Estados Unidos, para posteriormente ser reportada en otros integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* (Lee et al., 2016; Yigit et al., 2001). Actualmente, la distribución de estas enzimas es de

carácter global, generando desafíos desde el punto de vista terapéutico (Porreca et al., 2018). Posterior a este importante evento, en el año 2004 se describe una carbapenemasa transferible de la familia OXA, la enzima OXA-48, la que fue descrita en Turquía en un aislado de *K. pneumoniae* y gracias al plásmido que la porta ha sido diseminada en *Enterobacteriaceae* de varios continentes (Potron et al., 2013). Otras enzimas de tipo OXA habían sido descritas previamente en *Acinetobacter baumannii*, las cuales pertenecen a las familias de *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} y *bla*_{OXA-58} (Donald et al., 2000; Scaife et al., 1995). En el año 2009 se reporta otra importante enzima capaz de hidrolizar carbapenémicos, la metalo- β -lactamasa (MBLs) New Delhi o NDM, la cual fue identificada en una cepa recolectada desde un paciente hospitalizado en India, y al igual que las enzimas mencionadas anteriormente, NDM se transformó rápidamente en un fenómeno global. (Yong et al., 2009).

Desde el punto de vista clínico la presencia de gran parte de estas enzimas genera un aumento considerable en los niveles de resistencia a los carbapenémicos, convirtiéndose en un gran desafío, ya que las opciones terapéuticas contra estos patógenos multirresistentes son escasas y requieren tratamientos combinados que al menos incluyan un antibiótico de este tipo, generando una necesidad importante respecto al conocimiento de las carbapenemasas y la resistencia a β -lactámicos, específicamente carbapenémicos (Meletis, 2016).

Con la aparición de nuevas variantes de β -lactamasas, se hace necesario un sistema de clasificación que ayude a entender algunas características de estas y sus diferencias. Para la clasificación de estas enzimas, se han planteado dos aproximaciones, una funcional y otra molecular. La primera, propuesta por Bush-Jacoby-Meridios en 1995, es una clasificación basada en las características bioquímicas utilizando sus puntos isoelectricos, el perfil de sustratos y las características para su inhibición (Bush et al.,

1995). Con el paso de los años, esta clasificación también ha sido actualizada, y en la actualidad las enzimas son clasificadas en cuatro grupos principales (1-4), con nuevos subgrupos según la última actualización, en donde, de manera general, el grupo 1 incluye cefalosporinasas (Jacoby, 2009). El grupo 2, el cual es el más amplio, tiene subgrupos como el grupo 2a que incluye penicilinasas que predominan en especies Gram positivas, mientras que el subgrupo 2b incluye enzimas capaces de hidrolizar penicilina, así también como algunas cefalosporinas de primera generación, siendo enzimas que son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam (Bush et al., 1995). Luego, se encuentra el subgrupo 2c, el que incluye penicilinasas que son capaces de hidrolizar ticarcilina más que bencilpenicilinas y que son fácilmente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam (Bush et al., 1995; Bush & Jacoby, 2010). El grupo 2d está constituido por enzimas capaces de hidrolizar cloxacilina u oxacilina, siendo las enzimas conocidas como OXAs. En el caso del subgrupo 2e, este incluye enzimas cefalosporinasas capaces de degradar cefalosporinas de amplio espectro, y, al igual que las anteriores, son inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam y se diferencian del grupo 1 por su baja afinidad con aztreonam (Bush, 1989; Bush & Jacoby, 2010). El subgrupo 2f incluye serino carbapenemasas que pueden ser inhibidas por el tazobactam más que con ácido clavulánico en comparación al grupo 3, el que incluye metalo- β -lactamasas, las que se pueden distinguir por el requerimiento de zinc en su sitio activo. Finalmente, en la última actualización de esta clasificación se omite el grupo 4, el cual originalmente incluía enzimas que las cuales han sido añadidas a los grupos 1 y 3, y específicamente las carbapenemasas han sido clasificadas principalmente en los grupos 2d, 2f y 3 (Bush & Jacoby, 2010; Halat & Moubareck, 2020).

Por otro lado, la clasificación más utilizada en la actualidad corresponde a la clasificación molecular propuesta por Ambler, la cual categoriza a las β -lactamasas en 4 grupos: A, B, C y D, siendo los grupos A, C y D conocidos como β -lactamasas con un sitio activo con una serina y el grupo B, conocido como metalo- β -lactamasas (MBLs) por presentar moléculas de zinc en su sitio activo (Queenan & Bush, 2007). Esta clasificación estructural está basada en la homología aminoacídica y con ciertos aspectos relacionados con sus capacidades enzimáticas (Ambler, 1980).

Las carbapenemasas de clase A presentan un perfil hidrolítico amplio, es decir, pueden hidrolizar todos los β -lactámicos excepto cefamicinas (Hammoudi, Moubareck, et al., 2014). Las enzimas pertenecientes a este grupo son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam y ácido borónico (Hammoudi, Ayoub Moubareck, et al., 2014), y pueden estar codificadas a nivel del cromosoma bacteriano, como ejemplo las enzimas NmcA, SME-1 (Enzima 1 de *Serratia marcescens*), SFC-1 (Carbapenemasa 1 de *Serratia fanticola*), SHV-38 (Variante 38 de sulfidril) y PenA descrita en el complejo *Burkholderia cepacia*, en donde estas enzimas presentan diversas variantes, pero son reportadas esporádicamente y no han sido descritas en elementos genéticos móviles, lo que justifica sus escasos reportes (Naas et al., 2016). Por otro lado, otras enzimas que se clasifican en el grupo A si se han descrito en plásmidos, como es el caso de imipenemasas (IMI), KPC y algunas variantes de GES (*Guiana-Extended-Spectrum β -lactamase*), en donde en la actualidad la carbapenemasa de clase A más relevante es el grupo KPC debido a su asociación con plásmidos conjugables, siendo generalmente reportadas en aislados de *K. pneumoniae*, el cual presenta una gran capacidad para acumular y transferir determinantes de resistencia (Naas et al., 2016). Actualmente, estas enzimas se han reportado en una gran variedad de especies bacterianas, desde integrantes de *Enterobacteriaceae*, así como también en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Halat & Moubareck, 2020; Martinez et al., 2016)

En el caso de las carbapenemasas de clase B o MBLs, éstas presentan un amplio espectro de sustratos y pueden hidrolizar todos los β -lactámicos, exceptuando monobactámicos como el aztreonam (Jeon et al., 2015). Estas enzimas son resistentes a los inhibidores de β -lactamasas, pero son susceptibles a ser inhibidas por quelantes de metales como EDTA (Queenan & Bush, 2007). Estas enzimas originalmente fueron identificadas en aislados ambientales y en patógenos oportunistas como *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp., *Legionella gormanii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella* spp., y *Stenotrophomonas maltophilia* (Walsh et al., 2005). Las MBLs más comunes son IMP (imipenemasa), VIM (*Verona-integron-encoded metallo- β -lactamasa*), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), GIM (*German imipenemasa*), y SIM (*Seoul imipenemasa*) y son encontradas normalmente asociadas a integrones, los cuales se pueden asociar a cassettes genéticos, transposones y plásmidos, lo que facilita su diseminación entre diferentes especies bacterianas (Diene & Rolain, 2014). En la actualidad, de las enzimas pertenecientes a la clase B, las variantes de NDM se han convertido en un gran problema, ya que presentan una actividad carbapenemasa mejorada, y las cuales han sido identificadas en más de 60 especies bacteriana pertenecientes a 11 distintas familias presentes en plásmidos portadores del gen *bla*_{NDM} lo que ha favorecido su diseminación (Wu et al., 2019).

Las β -lactamasas emergentes de clase C otorgan resistencia a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y aztreonam (Jeon et al., 2015). En este grupo existen enzimas tales como ACC-1 reportada en plásmidos en aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Salmonella entérica* y *E. coli*, la cual otorga resistencia a ciertas cefalosporinas (Bae et al., 2019). Otra integrante de esta clase son las enzimas de tipo AmpC, las cuales son cefalosporinasas que no son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas tales como ácido clavulánico, pero si por el ácido borónico (Hammoudi,

Moubareck, et al., 2014). Algunas variantes de AmpC presentan actividad de carbapenemasa, pero estas pueden agravar la resistencia a carbapenémicos cuando co-existen con otros mecanismos tales como la impermeabilidad de membrana y/o la producción de bombas de expulsión (Jacoby, 2009).

Finalmente, las carbapenemasas tipo OXA, pertenecientes a la clase D de Ambler, son enzimas que en sus inicios eran raramente identificadas en plásmidos, y se denominan así por su capacidad de hidrolizar oxacilina, meticilina y cloxacilina, las que tienen baja efectividad contra cefalosporinas de primera generación (Kaitany et al., 2013). Su sitio activo, al igual que las de clase A y C, tiene un residuo de serina. Estas enzimas han sido descritas inicialmente en bacterias Gram negativas, en donde originalmente se caracterizaban por poseer la capacidad de hidrolizar penicilinas y, posteriormente, se identificaron variantes con un especto extendido siendo capaces de hidrolizar ceftazidima, llegando a presentar variantes con capacidad de carbapenemasas, siendo principalmente las familias de OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-58, OXA-143 y OXA-235, en donde la primera de estas se identificó en plásmidos de aislados de *A. baumannii* MDR (Queenan & Bush, 2007). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar cefalosporinas, aminopenicilinas, piperacilina, oxacilina, aztreonam y carbapenémicos (Kaitany et al., 2013). Clásicamente, estas enzimas han presentado una capacidad de hidrolisis más baja que otras carbapenemasas, pero en el caso de *A. baumannii*, es suficiente para aumentar los niveles de resistencia hasta el punto de considerarlas resistentes (Evans & Amyes, 2014). Es así como se ha descrito que la expresión de OXA-23 junto con la presencia de bombas de expulsión incrementan significativamente los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de carbapenémicos (Evans & Amyes, 2014; Kaitany et al., 2013). Generalmente, las enzimas del grupo OXA-23 están ubicadas en plásmidos y flanqueadas por 2 copias de la secuencia de inserción (IS) IS*Aba1* en transposones como el Tn2006 y Tn2008, en donde las IS pueden otorgar promotores

fuertes que generan la sobreexpresión de las enzimas tipo OXA-23, mediando la resistencia a carbapenémicos (Turton, Ward, et al., 2006). Posteriormente, se describieron nuevos grupos de carbapenemasas tipo OXA, en donde el grupo OXA-58 se identificó por primera vez en el año 2005, las cuales son capaces de hidrolizar penicilinas, oxacilinas e imipenem, pero no cefalosporinas de espectro extendido (Poirel et al., 2005a). Tanto los grupos OXA-23 co-mo OXA-58 se han descrito mayormente en *A. baumannii* y muy rara vez han sido identificadas en *Enterobacteriaceae*, siendo reportada en aislados de *Proteus mirabilis* (Bonnin et al., 2020; Poirel et al., 2005b).

Por otro lado, la familia de OXA-24 posteriormente llamada OXA-40, que incluye variantes como OXA-72, fueron descritas 10 años después de OXA-23 y presentan una homología del 40% con variantes como OXA-10, siendo considerada inicialmente como una carbapenemsas cromosomal, sin embargo, en la actualidad se ha descrito en plásmidos capaces de ser transferidos. (Bou et al., 2000, 2006; Dortet et al., 2016; Klotz et al., 2018)

En 2009 se describe un nuevo grupo de carbapenemasas tipo OXA, OXA-143, las cuales son capaces de hidrolizar penicilinas, oxacilinas, meropenem e imipenem, y tienen actividad sobre cefalosporinas de espectro extendido (Higgins et al., 2009). Al igual que las familias de OXA-23 y OXA-58, esta ha sido reportada en plásmidos en aislados de *Acinetobacter* spp., pero no flanqueada por IS (Evans & Amyes, 2014; Halat & Moubareck, 2020). Otro grupo de carbapenemasas tipo OXA descrito corresponde a OXA-235, el cual fue reportado el año 2013 en aislados de *A. baumannii*, en donde su expresión reduce la susceptibilidad a carbapenémicos, pero no afecta la CMI de las cefalosporinas, las cuales han sido reportadas en otras especies de *Acinetobacter* como es el caso de *A. lwoffii* (Higgins et al., 2013).

A diferencia de las OXAs anteriormente mencionadas y descritas en *Acinetobacter*, la familia de OXA-48 están altamente asociadas a especies de *Enterobacteriaceae* y al igual que otras carbapenemasas, se ha convertido en una preocupación importante para la resistencia a carbapenémicos, siendo principalmente descrita en *K. pneumoniae*, teniendo actividad frente a carbapenémicos reducida, pero presentando más actividad frente a imipenem que a meropenem y resultando en un incremento moderado en la CMI de cefalosporinas de espectro extendido (Evans & Amyes, 2014). Por otro lado, no poseen una capacidad hidrolítica significativamente alta sobre a ceftazidima y cefepima, pero en combinación con la impermeabilidad de membrana puede generar altos niveles de resistencia a carbapenémicos (Jean et al., 2015). Estas enzimas se han descrito en plásmidos incorporadas en transposones de la familia Tn1999, en los cuales el gen de *bla*_{OXA-48} es flanqueado por IS1999, permitiendo que variaciones de esta IS pueden actuar como promotores de expresión de este gen (Aubert et al., 2006; Carrër et al., 2008). Sin embargo, esta familia de enzimas también han sido descritas a nivel cromosomal (Turton et al., 2016)

Carbapenemasas en Latino América y el Caribe

Tal como se ha mencionado anteriormente, los bacilos Gram negativos como *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* son los principales patógenos multirresistentes, los que presentan mecanismos de resistencia a carbapenémicos, tales como β -lactamasas capaces de hidrolizar estos antibióticos (Jean et al., 2015). La distribución de cepas portadoras de estas enzimas es global, en donde Latinoamérica y el Caribe no están exentos de esta problemática, siendo un desafío para los laboratorios

clínicos y para la salud pública (García-Betancur et al., 2021).

En relación con las carbapenemasas de clase D u OXAs, estas han sido reportadas con gran predominancia al igual que las MBLs, siendo las variantes de OXA-51 y OXA-72 las más prevalentes en países como México, Brasil y Ecuador (Chagas et al., 2017; Nuñez Quezada et al., 2017). En Argentina, *A. baumannii* productor de carbapenemasas del grupo OXA-23 ha desplazado a las productoras de enzimas del tipo OXA-58 (Rodríguez et al., 2019); por otro lado, recientemente se han descrito carbapenemasas del grupo OXA-143 en *A. baumannii* en Perú y Brasil (Levy-Blitchtein et al., 2018; Mostachio et al., 2012). En el caso de las carbapenemasas pertenecientes al grupo OXA-51, se ha descrito que su sobreexpresión mediada por IS confiere resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* (Evans & Amyes, 2014). lo que ha sido ampliamente descrito en la región (Chagas et al., 2014; Opazo-Capurro et al., 2019). Finalmente, las enzimas de la familia de OXA-48 se han detectado con menor frecuencia en Latinoamérica, siendo reportada recientemente en cepas de *Enterobacteriaceae* en Chile. (Araya et al., 2021; Carrasco-Anabalón et al., 2018)

***Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (ABRC)**

Como se mencionó anteriormente, *A. baumannii* es un patógeno perteneciente al grupo ESKAPE, siendo una especie bacteriana comúnmente resistentes a múltiples antibióticos de importancia clínica como lo son los carbapenémicos, siendo las cepas de *A. baumannii* resistente a los carbapenémicos (ABRC) consideradas de prioridad crítica según la OMS (Venkateswaran et al., 2023). *A. baumannii* es causante de diversas infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), siendo las más relevantes las

neumonías asociadas a ventilación mecánica, infecciones de heridas de quemadura y otras; además posee la capacidad de sobrevivir a diversas condiciones ambientales, tales como desecación, y a pH extremos, siendo un desafío su erradicación de las unidades de cuidados intensivos (Chapartegui-González et al., 2018; Munoz-Price et al., 2012).

Un ejemplo de lo anterior, es el aislamiento de ABRC en soldados que retornaban de zonas de conflicto como Iraq y Afganistán durante el 2006 y 2008, en donde dichas cepas se relacionaban genéticamente con cepas aisladas posteriormente en las superficies de hospitales de campaña en dichas zonas presentando características de resistencia a carbapenémicos, siendo este hecho un claro ejemplo de lo que hoy es una característica de relevancia en la población de ABRC, su impacto intrahospitalario y su diseminación internacional (Peleg et al., 2008).

En la actualidad, los últimos datos publicados por Murray *et al.* cuantifican las muertes globales directamente atribuibles y asociadas a infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* resistente a antibióticos. Específicamente, este trabajo atribuye 57700 muertes a nivel global a infecciones causadas por cepas de ABRC, siendo esta una de las especies bacterianas resistentes a carbapenémicos con un mayor número de muertes totales (L Murray et al., 2022).

Los brotes de ABRC ocurren en diversos hospitales del mundo, siendo históricamente asociados a un determinado grupo de clones o linajes que son considerados como multirresistentes, o de “alto riesgo”(Hamidian & Nigro, 2019). De estos clones, existen dos linajes que son los más frecuentemente relacionados con

brotes, siendo conocidos como clon global 1 y clon global 2 o clon internacional 1 (IC1) y clon internacional 2 (IC2) (Müller et al., 2023). Con la masificación de las técnicas de secuenciación de genomas completos, existe cada vez mas información disponible sobre las características genómicas de dichos linajes. Por ejemplo, en el año 2019, en la base de datos GenBank habían alrededor de 3609 genomas depositados de *A. baumannii*, correspondiendo alrededor de 2190 al IC2 y 173 al IC1. Estos clones se pueden definir también mediante la asignación de secuenciotipo (ST) por MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) planteada por el Instituto Pasteur, definiendo el IC1 a partir del ST1 y sus variantes de un solo locus, y el IC2 a partir del ST2 y sus variantes de un solo locus, siendo el linaje de mayor predominancia el ST2, con casi el 59% del total de los genomas disponibles en GenBank (Hamidian & Nigro, 2019). Además, gran parte de estos genomas de IC2 presentaban genes de resistencia a carbapenémicos, por lo que este linaje representa una seria amenaza para la salud pública, siendo catalogado como un clon de “alto riesgo” (Hamidian & Nigro, 2019). Por otro lado, en Europa se ha reportado la presencia de un tercer clon internacional (IC3), el que presenta como principales mecanismos de resistencia a carbapenémicos la expresión del gen *bla*_{OXA-23} (Karah et al., 2012; Müller et al., 2023). Interesantemente, en Latinoamérica, la estructura de la población de ABRC es diferente a otras regiones del mundo, detectándose cepas pertenecientes a los STs ST15 y ST79, los que corresponden a IC4 y IC5, respectivamente (Kumar et al., 2020; Müller et al., 2023). Cepas de ABRC pertenecientes a estos clones se han reportado en Brasil, Chile, Ecuador y Argentina, siendo asociados a un fenotipo XDR (Kumar et al., 2020). Otros reportes y estudios relacionados con la distribución de estos clones han revelado que los principales mecanismos de resistencia a carbapenémicos corresponden a la presencia de los genes de *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-58} y al arreglo genético de *bla*_{OXA-51}/*ISAbal* (Opazo-Capurro et al., 2019; Rodríguez et al.).

Como se aprecia en la **Figura 1**, la estructura de la población de *A. baumannii* presenta una gran diversidad, en donde los IC presentan una gran cantidad de variantes de un único locus, conformando complejos clonales formados por una gran cantidad de ST (Opazo-Capurro et al., 2019). En el caso del IC4 correspondiente al de mayor predominancia en Latinoamérica, incluyendo nuestro país, dista bastante de los principales complejos ampliamente distribuidos a nivel mundial, al igual que otros STs reportados en Chile como el ST162 y el ST109 (Hamidian & Nigro, 2019; Opazo-Capurro et al., 2019)

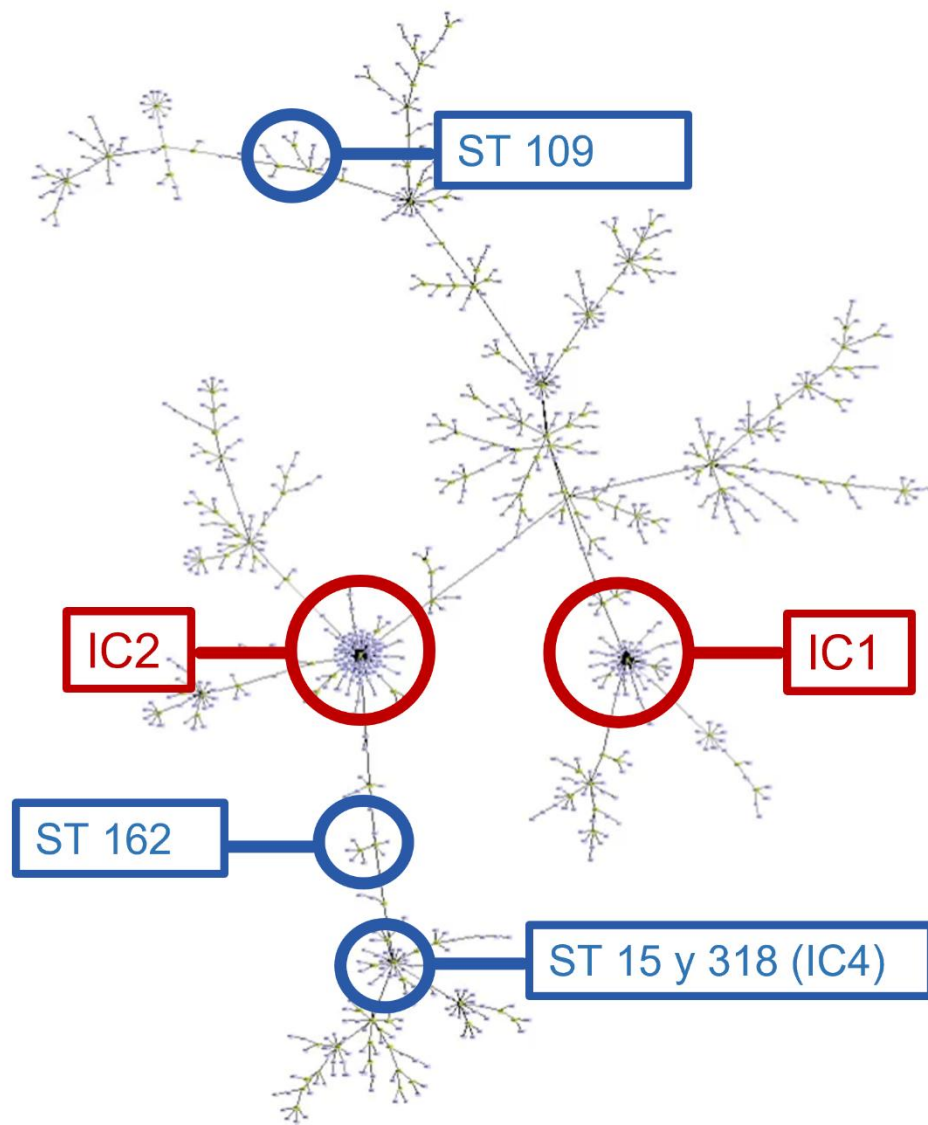


Figura 1: Estructura de la población de *A. baumannii* basada en los datos del MLST, y generado por el software goeBurst

CAPÍTULO III: Elementos genéticos móviles y secuenciación del genoma completo

Transferencia horizontal de genes

La transferencia de material genético es generalmente de naturaleza vertical, es decir, de células/organismos progenitores a la descendencia, suceso que ocurre de igual manera en células procariontes, sin embargo, en bacterias y otros microorganismos se presentan además otros métodos de movilización de material genético, los que corresponden a mecanismos de “transferencia horizontal de genes” (THG) (Narra & Ochman, 2006), es decir, la posibilidad de compartir material genético con otros organismos e incluso adquiriendo material genético libre en el ambiente, siendo la THG una piedra angular en la adaptación y evolución de las bacterias a diferentes condiciones (Soucy et al., 2015).

La THG en bacterias puede estar mediada por diferentes metodologías siendo una de ellas la transformación propuesta por Griffith en 1928, la cual es definida como la capacidad de una célula de adquirir material genético exógeno presente en el medio (Griffith, 1928). Posteriormente, Zinder y Lederberg en 1952 describieron el proceso de transducción por el cual la transferencia de material genético es mediada por bacteriófagos durante el proceso de infección en la bacteria (Zinder & Lederberg, 1952). Por otro lado, recientemente se ha demostrado el rol que juegan las vesículas de

membrana externa (OMVs del inglés *outer membrane vesicles*) las que a la fecha se consideran otro mecanismos de THG pudiendo transportar material genético de una célula a otra (García-Aljaro et al., 2017; Sartorio et al., 2021). Finalmente, el cuarto mecanismo de THG corresponde a la conjugación, descrita por Lederberg y Tatum en 1946, la cual se basa en la transferencia de material genético por contacto entre dos células (Lederberg & Tatum, 1946). En la figura 2 se resumen los diferentes mecanismos mencionados anteriormente.

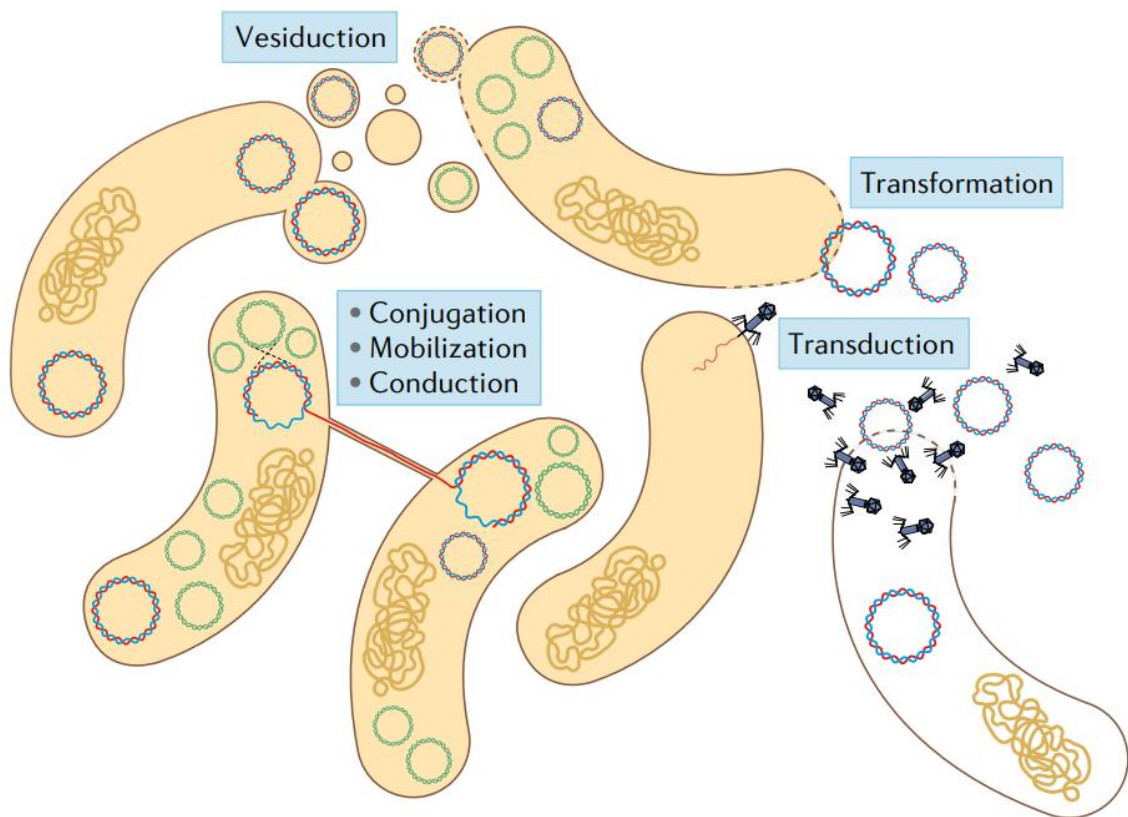


Figura 2: Mecanismos de transferencia horizontal de genes. Figura extraída de (García-Aljaro et al., 2017.).

Si bien la THG se presenta como una gran ventaja adaptativa, esta presenta una serie de barreras que debe atravesar el material genético exógeno para ser incorporado efectivamente al genoma bacteriano. En primer lugar, debe ingresar a la célula por algunos de los mecanismos mencionados antes, posteriormente debe ser capaz de evadir la destrucción enzimática por parte de los sistemas de defensa de la célula receptora. Además, debe ser estable y mantenerse en la célula, además de los posibles eventos de recombinación, lo que genera finalmente que solo una pequeña cantidad de eventos de THG resulten ser efectivos (Hall et al., 2020).

Determinar la relevancia e impacto en la adaptación y evolución de las bacterias debido a los procesos de THG es difícil pero necesario. Estos se basan principalmente en la “infección” de la célula bacteriana por elementos genéticos móviles (EGMs) como el genoma de bacteriófagos, elementos integrativos conjugativos (ICEs) y plásmidos, teniendo cada uno de estos sus propias limitaciones. Por ejemplo, los bacteriófagos afectan a bacterias que presentan altos grados de similitud genética, por lo que la transducción solo puede ocurrir entre bacterias altamente relacionadas. Por otro lado, en el caso de los plásmidos y los elementos conjugativos, estos han demostrado la capacidad de atravesar la barrera de las especies bacterianas, lo que depende principalmente del espectro de movilización y su rango de hospederos (Redondo-Salvo et al., 2020). Sin embargo, todos los mecanismos de THG han demostrado haber favorecido la adaptación de bacterias que hoy en día son consideradas de importancia para la salud humana, específicamente en las bacterias con elevados niveles de resistencia a los antibióticos categorizadas por la OMS y mencionadas en el primer capítulo, incluyendo a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, evidenciando la importancia de la movilización de material genético en la adquisición de determinantes de resistencia y como consecuencia su adaptación al ambiente clínico y su capacidad de resistir la

presencia de antibióticos (Lerminiaux & Cameron, 2019).

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de THG han permitido la adaptación de bacterias en diferentes entornos, siendo el ambiente o el espacio físico donde ocurren dichos procesos es un factor relevante para evaluar el impacto y la importancia de cada uno de estos. En el ambiente hospitalario la movilización de EGMs mediante conjugación ha demostrado tener una gran impacto, considerando que los genes de resistencia a antibióticos de mayor relevancia hoy en día, como lo son variantes del gen *mcr* (resistencia a polimixinas) y carbapenemasas como KPC y NDM, e incluso la carbapenemasas tipo OXA como OXA-23, OXA-58 y OXA-72, han sido pesquisada en plásmidos conjugativos y otros EGMs altamente movilizables (Hamidian & Nigro, 2019; Shen et al., 2022; Wang et al., 2018; Wu et al., 2019b; X. Yang et al., 2021).

Elementos genéticos móviles asociados a *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos.

En *A. baumannii* es posible encontrar una gran variedad de EGMs asociados a determinantes de resistencia a los antibióticos, (Figura 2), siendo las más importantes las secuencias de inserción (IS), transposones (Tn), integrones y plásmidos conjugativos (Noel et al., 2022)

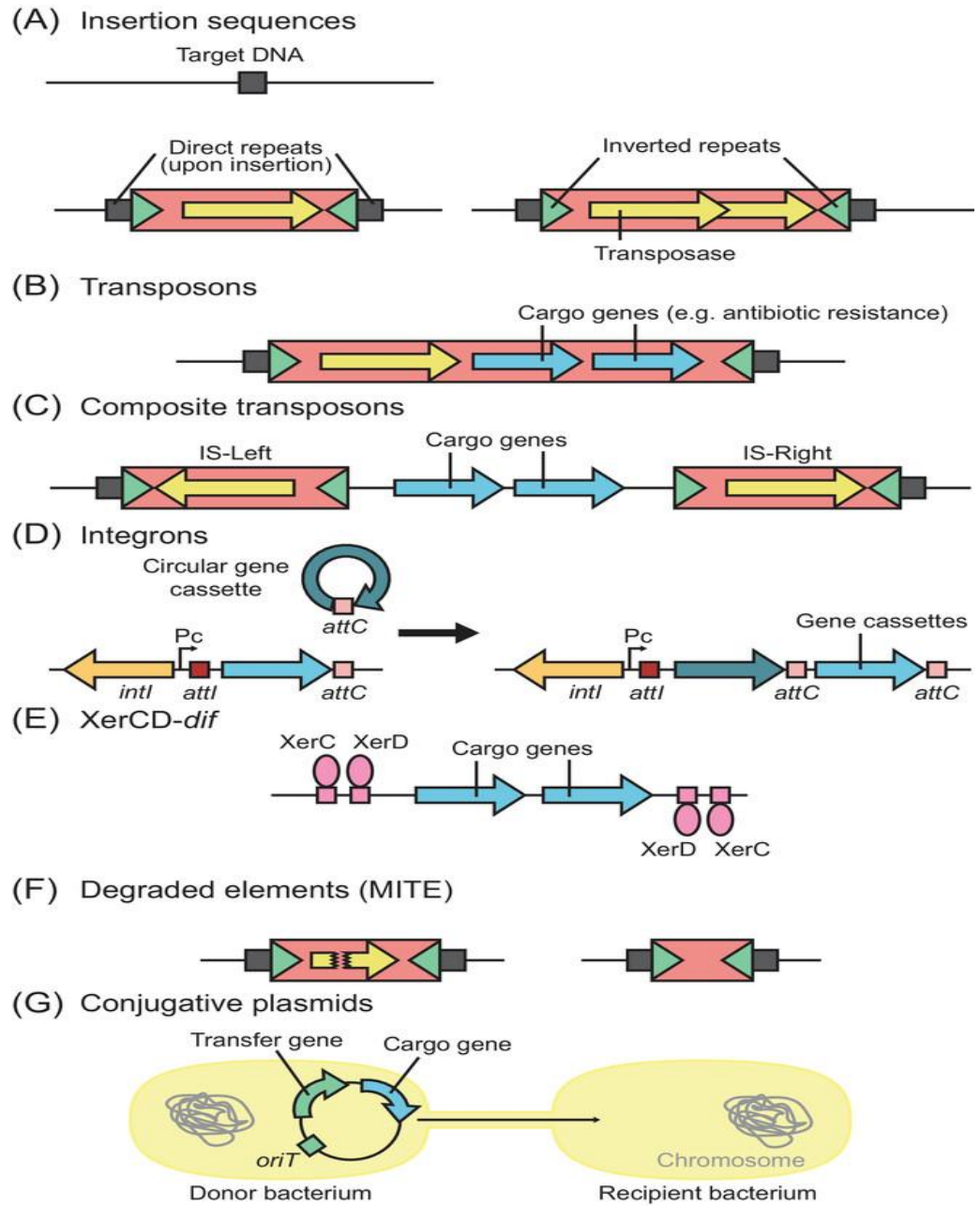


Figura 3: Elementos genéticos móviles (EGM) que contribuyen a la resistencia a los antibióticos en *A. baumannii*

A) Secuencias de inserción. B) Transposones. C) Transposón compuesto. D) Integrones. E) XerCD-dif F) Elementos transponibles de repetición invertida en miniatura (MITE.). G) Plásmidos conjugativos. Figura extraída de (Noel et al., 2022)

Las IS corresponden a los EGMs más simples y de menor tamaño, poseen un tamaño aproximado de 1000 pb flanqueadas por secuencias invertidas repetidas las que generalmente rodean a marcos de lectura abierto que codifican a genes de transposasas, cuya función es la integración y la escisión de estos elementos en el genoma (Babakhani & Oloomi, 2018). La transposición de las IS puede ser “sitio-específico” o “aleatoria” por lo que poseen un importante rol en la variabilidad genética de las bacterias (Romano & Fanti, 2022). Por otro lado, las ISs son capaces de mediar la resistencia a los antibióticos en *A. baumannii* al proveer de promotores fuertes que generan la sobreexpresión de genes de resistencia, como por ejemplo en la resistencia a β -lactámicos mediadas por la asociación de IS a genes *ampC* o *bla*_{ADC} que codifican cefalosporinasas, o en el caso de carbapenemasas intrínsecas OXA-51, en donde su ubicación río arriba del gen puede promover fuertemente la expresión de estos genes, otorgando un fenotipo resistente (Hamidian & Hall, 2013; Turton, Ward, et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito la presencia de IS*Aba1* río arriba del gen *bla*_{OXA-23} en cepas resistentes a carbapenémicos lo que aumenta la expresión de esta enzima, generando un fenotipo resistente a carbapenémicos (Abouelfetouh et al., 2022). Si bien los mecanismos mencionados anteriormente tienen relación con la sobreexpresión de ciertos genes de resistencia, las IS también pueden disminuir o interrumpir ciertos genes, como en el caso de algunas porinas. Específicamente, se ha descrito en *A. baumannii* la interrupción del gen de la porina *carO* mediada por la presencia de IS*Aba825*, IS*Aba125*, IS*Aba10*, o IS*Aba27*, generando la interrupción de la porina CarO, por lo que el ingreso de carbapenémicos a la célula bacteriana disminuye (Y. Lee et al., 2011; Mussi et al., 2005). Otro ejemplo importante corresponde a la disrupción del sitio blanco de antibióticos, en donde se ha descrito que IS*Aba11* es capaz de inactivar la biosíntesis del lípido A, específicamente a través de la interrupción de los genes *lpxA* y *lpxC*, generando la pérdida del sitio blanco de

polimixinas, como colistín, en cepas *A. baumannii* probadas *in vitro* (Girardello et al., 2017; Moffatt et al., 2011).

Un tipo de EGMs más complejo que las IS corresponden a los transposones, cuya estructura corresponde a la agrupación de múltiples genes, incluyendo de resistencia a antibióticos, los que se encuentran flanqueados por IS, por lo que son elementos de mayor tamaño (Babakhani & Oloomi, 2018; Romano & Fanti, 2022). Estos, al igual que las IS, se movilizan mediante la actividad de las enzimas de la familia de las transposasas, las que reconocen secuencias repetidas para luego insertarse ya sea mediante recombinación sitio-específica o aleatoria (Babakhani & Oloomi, 2018). En el caso de *A. baumannii*, existen ciertas familias de transposones que se relacionan con genes de resistencia importantes desde el punto de vista clínico, como en el caso del gen *bla_{OXA-23}*, el cual se ha descrito en los transposones Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2008B y Tn2009 en donde la prevalencia de estas estructuras varía según la localización geográfica de las cepas (Nigro & Hall, 2016).

Con respecto a los integrones, estos elementos genéticos codifican para una enzima denominada integrasa, la cual tiene actividad de recombinasa “sitio específica”, por lo que pueden incorporar ciertos arreglos genéticos en su zona variable (Hall, 2013). En *A. baumannii*, la presencia de integrones clase 1 que portan múltiples genes de resistencia a antibióticos se ha demostrado que se transfieren entre cepas (Gombac et al., 2002; Martins et al., 2015). Específicamente, se ha descrito que distintas especies de *Acinetobacter*, como por ejemplo *A. pittii* y *A. nosocomialis*, son capaces de codificar integrones clase 1 asociados a genes de resistencia a tobramicina, (*aadB*) y a *aadA2*, el cual otorga resistencia a estreptomicina (Chan et al., 2020; F. J. Chen et al., 2019). Además, existen arreglos genéticos que relacionan integrones asociados con IS como IS91 llamados “*common regions*” (ISCr), siendo unidades transponibles, que han sido

descritas en cepas de *A. baumannii* resistentes a antibióticos debido a estos arreglos. Por ejemplo, se han reportado aislados de *A. baumannii* portadores de genes de resistencia a sulfonamidas (*sul2*) insertos en arreglos genéticos de este tipo, específicamente del tipo ISCR2 (Toleman et al., 2006). Por otro lado, se ha evidenciado la capacidad de ISCR1 de transportar y movilizar al gen *bla*_{NDM-1} en cepas de *A. baumannii* (Toleman et al., 2012; Wailan et al., 2016), poniendo en peligro la efectividad de los antibióticos carbapenémicos.

Por otro lado, también existe evidencia de la participación de otros EGMs menos estudiados que podrían asociarse a la resistencia antibióticos y su diseminación en *A. baumannii*, como los son los sitios XerCD *dif* de recombinación, los cuales son sitios que se han encontrado en esta bacteria flanqueando genes de resistencia a antibióticos en plásmido, en donde se han asociado a la adquisición de resistencia a antibióticos. El elevado número de estas secuencias en algunos plásmidos sugiere que no solo están relacionados a la resolución de dímeros, como los en los sitios de recombinación, no sólo favoreciendo la integración de ADN en un sitio específico si no que también favorecen la movilización de módulos entre plásmidos, generando la acumulación de regiones de ADN con funciones específicas (Balalovski & Grainge, 2020). Por otro lado, existe un elemento el cual se origina a partir de IS o Tn ancestrales, denominados MITEs o elementos transponibles miniaturizados de repetición invertida, los cuales conservan secuencias repetidas invertidas pero no codifican transposasas, pudiendo ser movilizados por la enzima de otro EGMs presente en el genoma. Estas estructuras se han encontrado flanqueado otros elementos de integrones en *Acinetobacter*, como por ejemplo la portación de *bla*_{IMP-5} en un aislado de *A. baumannii*, en donde dicho gen se encuentran flanqueado por MITEs (Domingues et al., 2011; Noel et al., 2022).

El estudio de EGMs permitió evidenciar la relación que existe entre ellos, estableciendo un modelo denominado modelo de “muñeca rusa”, es decir, que el elemento más pequeño puede estar contenido en los elementos más grandes, siendo el elemento más pequeño una secuencia de inserción o un único gen inserto en un transposón, el cual podría, posteriormente asociarse a integrones, los que a su vez pueden incorporarse en un EGM más grande y complejo, como es el caso de plásmidos (Noel et al., 2022). Estructuralmente, los plásmidos están conformados por diferentes módulos: un módulo de replicación (genes *rep* y *oriV*), un módulo de estabilidad (sistemas toxina-antitoxina), un módulo de transferencia (genes *tra* y genes *mob*) y genes accesorios que pueden otorgar funciones específicas extras (Noel et al., 2022). Este último módulo puede comprender genes relacionados con resistencia antimicrobiana, genes de patogenicidad y virulencia, genes relacionados con vías metabólicas, y además estos genes accesorios pueden codificar otros EGMs como IS y Tn, los que promueven la plasticidad genética, siendo también denominados módulos de adaptación (Brovedan et al., 2020; Noel et al., 2022).

Considerando lo anteriormente mencionado, uno de los aspectos importantes de los plásmidos es su capacidad de movilizarse, para lo cual existen diferentes mecanismos. La conjugación propiamente tal, considerado como el principal mecanismo por el cual se moviliza un plásmido, como se mencionó anteriormente, requiere del contacto entre dos células. En bacterias Gram negativas, este proceso es mediado por el pili sexual (García-Aljaro et al., 2017; Virolle et al., 2020), en donde los plásmidos que se transfieren por este mecanismo requieren de una estructura que permite el paso del plásmido de una bacteria a otras, el cual está codificado en lo que se denomina operón de transferencia (genes *tra*) o en el operón de virulencia (*vir*), las cuales son regiones que codifican las proteínas necesarias para la conjugación, es decir, proteínas relacionadas con la formación del pili, el sistema de secreción tipo 4 (T4SS), y componentes del

relaxosoma que permiten el procesamiento del plásmido previo a la transferencia. Para la formación de estas estructuras, se han descrito diversas proteínas Tra que cumplen funciones específicas y se mencionan en la **Tabla 1** (Bragagnolo et al., 2020; Virolle et al., 2020).

Tabla 1: Descripción de proteínas Tra (C: citoplasma; P: periplasma; IM: membrana interna; OM: membrana externa). Modificado de (Virolle et al., 2020).

Proteína	Función propuesta	Descripción	Localización	Proteína homóloga
TraM	Relaxosoma	Unión a <i>oriT</i> , estimulación de TraI	C	
TraJ	Regulación	Factor de transcripción con TraD (anti silenciador/activador de P _y)	C	
TraY	Relaxosoma y regulación	Unión a <i>oriT</i> , factor de transcripción (activador de P _M)	C	
TraA	Pilina	Subunidad mayor del Pili	IM	VirB2 y TrbC
TraL	Ensamblaje del pili	Ensamblaje del Pili	OM	VirB3 y TrbD
TraE	Ensamblaje del pili	Ensamblaje del Pili	IM/P	VirB5
TraK	Ensamblaje del pili	Canal de expansión de la envoltura celular	IM/P	VirB9
TraB	Extensión del pili	Canal de expansión de la envoltura celular	IM	VirB10 y TrbI
TraP	Extensión del pili	Estabilización de la extensión del Pili	IM	
TraG	Ensamblaje del pili	Ensamblaje del extremo del Pili	IM	VirB6/VirB8
	estabilización del par conjugante	Estabilización vía C-terminal interactuando con TraN		
	Exclusión	Interacción con TraS		
TraV	Extensión del Pili	Lipoproteína	OM/P	VirB7
TraR	Regulación	Regulación de la transcripción mediada por la unión de RNA a la polimerasa	C	
TraC	Ensamblaje del Pili	NTPase	IM	VirB4 y TrbE
TraW	Extensión del Pili	Síntesis del Pili	P	
TraU	Transferencia ADN	Transferencia ADN	P	
TraN	Estabilización del par conjugante	Estabilización de la unión OmpA y LPS	OM	
	Sistema de exclusión	Interacción con TraG		
TraF	Extensión del Pili	Enlaces disulfuro para el ensamblaje de T4SS	P	
TraQ	Maduración del pilis	Chaperona Like	IM	
TraH	Extensión del Pili	Interacción con TraF y TraU	P	
TraS	Exclusión de entrada	Interacción con TraG	IM	
TraT	Exclusión de superficie	Desagregación del par conjugante después de la transferencia de ADN, interferencia con la interacción TraN-OmpA	OM	
TraD	T4CP	Proteína de emparejamiento, ATPase dependiente de ADN, interacción con TraM	IM	VirD4, TraG y TrwB
TraI	Relaxosoma	Relaxasa, transesterasa y helicasa	C	VirD2 y TrwC
TraX	Maduración del pilis+B2:B29	Acetilasa N terminal	IM	TrbP

Por otro lado, existen plásmidos considerados movilizables, que a diferencia de los anteriormente mencionados plásmidos conjugativos, solo portan componentes del relaxosoma como *oriT*, genes de relaxasa y algunas proteínas auxiliares, y no portan la maquinaria de conjugación relacionada a las proteínas Tra (Smillie et al., 2010). Además, existe otro tipo de plásmidos, los cuales no portan ni genes *tra* ni genes *mob*, por lo que se consideran no movilizables y que aun así pueden ser transferidos mediante un mecanismo denominado conducción, el cual requiere la cointegración mediada por recombinación de un plásmido no movilizable con un plásmido movilizable o conjugativo (García-Aljaro et al., 2017).

Los elementos genéticos conjugativos han contribuido ampliamente a la diseminación de genes de resistencia en el género *Acinetobacter*, teniendo un impacto mayor que otros fenómenos de transferencia horizontal como la transformación y la transducción (Leungtongkam et al., 2018; Von Wintersdorff et al., 2016). Ejemplos de lo mencionado anteriormente se refleja en el trabajo de Salgado *et al*, en el cual se establecen linajes de plásmidos de *A. baumannii* presentan con un mismo “core” de genes y evidenciando genes de resistencia y EGMs, como IS y Tn, son elementos adquiridos de forma secundaria, resultando en familias de plásmidos con módulos de movilización que podrían aportar al entendimiento de la diseminación de genes de resistencia mediante THG (Salgado-Camargo et al., 2020). Un ejemplo más concreto del rol que juega la conjugación en la transferencia de determinantes de resistencia es el trabajo realizado por Hamidian *et al* en el año 2014, en el cual lograron transferir un plásmido conjugativo portador del gen *bla*_{OXA-23} situado en un transposón compuesto Tn2006 y además flanqueado por IS*Aba1* (Hamidian et al., 2014). Además estas dinámicas de transferencia horizontal de plásmidos portadores de genes de resistencia no se limita solo a cepas pertenecientes a IC de relevancia, sino que también se describen en aislados de IC considerados menos prevalentes como IC4 y IC5, presentando

plásmidos que codifican genes de resistencia y diferentes EGMs como IS y Tn, los cuales se han pesquisado en diferentes géneros bacterianos, reflejando que estos plásmidos encontrados en *A. baumannii* contribuyen a la diseminación de la resistencia a los antibióticos (Cerezales et al., 2020).

Estudio y caracterización de plásmidos de *A. baumannii*

Desde el descubrimiento de los plásmidos, estos se han posicionado como una importante herramienta que permite a las bacterias adaptarse. Desde el punto de vista evolutivo, los plásmidos que proveen a las bacterias de ventajas adaptativas y tienen poco impacto en el *fitness* bacteriano en un contexto determinado (ej.: ambiente hospitalario) son los que se mantienen en las diferentes generaciones, por lo que hoy en día se vuelven blanco de estudios que permitan entender sus capacidades y características (Brovedan et al., 2020).

La identificación y caracterización de los plásmidos busca entender el impacto que tienen en sus hospederos y sus mecanismos de transmisión, siendo la clasificación de plásmidos una estrategia ampliamente utilizada para iniciar un proceso de caracterización, entregando información clínica y epidemiológica que permite seguir el proceso evolutivo (Brovedan et al., 2020). Desde este punto de vista, se han generado diversos esquemas de tipificación y clasificación de plásmidos basados en la identificación de zonas conservadas en módulos de replicación y en el módulo de transferencia (Alvarado et al., 2012; Carattoli et al., 2005). En estas zonas existen diversas regiones que han sido utilizadas para la tipificación de plásmidos, una de las más utilizadas corresponde a la asignación de grupos de incompatibilidad (*Inc Groups*), definida como la

imposibilidad que tienen dos plásmidos de coexistir en generaciones de bacterias debido a presentar alta similitud en la región denomina replicón y en sus sistemas de control de la replicación (Thomas, 2014). Sin embargo, estos esquemas han favorecido el estudio de plásmidos de bacterias Gram negativas y específicamente en bacterias de la familia de *Enterobacteriaceae* y algunas bacterias Gram positivas, con aproximaciones de clasificación basadas en la tipificación del replicón mediante esquemas de PCR (Carattoli et al., 2005), y no incluyen a bacterias del género *Acinetobacter* esto debido a que los plásmidos presentes en las bacterias anteriormente mencionadas no son estables en este género y a su vez los plásmidos presentes en este no son estables en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, por lo que se requieren esquemas de clasificación y tipificación basados en secuencias de replicón exclusivas para este género bacteriano (Bertini et al., 2010; Brovedan et al., 2020).

El estudio de los EGMs y la microbiología en general han sido impulsadas por el desarrollo de tecnologías de secuenciación, esto ha permitido profundizar en el entendimiento de los genes presentes en estas estructuras genéticas móviles. Como se mencionó anteriormente, los plásmidos de *A. baumannii* requieren aproximaciones exclusivas, siendo una de las primeras aproximaciones propuesta en el año 2010, en la cual ya existía la posibilidad de acceder a una pequeña cantidad de secuencias de plásmidos de esta especie bacteriana. En base a esta información, se planteó un protocolo similar a lo empleado en bacterias del grupo de *Enterobacteriaceae* basado en PCR, denominado tipificación basada en amplificación por PCR del replicón (PBRT, del inglés *PCR-Based Replicon Typing*) (Carattoli et al., 2005). Específicamente, Bertini et al plantean la adaptación de un PBRT específicamente para *Acinetobacter*, el cual se basa en 15 secuencias de plásmidos, de los cuales 12 de ellos derivaban de 5 secuencias de genomas completos, junto a 8 secuencias parciales. De estos, cuatro plásmidos presentaban genes *rep* altamente relacionados, dos plásmidos presentaban dos de estos

genes y un plásmido presentaba 3. En resumen, un total de 24 secuencias de genes *rep* fueron examinadas en esta primera aproximación práctica, finalmente denominada como tipificación basada en la amplificación por PCR del replicón para *A. baumannii* (AB-PBRT). Los plásmidos incluidos en este esquema portan principalmente genes pertenecientes a la familia Rep3, y solo dos plásmidos pertenecen a la familia Rep1. Finalmente, se propuso incluir diecinueve grupos de homología (GR1-GR19), en donde esta clasificación presenta un porcentaje de identidad de 74% en las secuencias para poder diferenciar cada GR. Sin embargo, en un mismo grupo existen genes *rep* con diferencias suficientes para denominarlas con asignaciones diferentes, por ejemplo el GR2 incluye Aci1 y Aci2 (Bertini et al., 2010). En un estudio, este esquema de PCR fue utilizado en 96 aislados europeos resistentes a múltiples antibióticos con el fin de clasificar sus plásmidos, revelando que estos pertenecían principalmente a los grupos *repAci1* (GR2) y *repAci6* (GR6) (Bertini et al., 2010; Lam et al., 2023). Con el paso de los años, las técnicas de secuenciación se han masificado, permitiendo el acceso a nuevas secuencias de genomas completos y por ende a nuevas secuencias de plásmidos, lo que permitió diferenciar con mayor precisión los genes *rep* que se asignaban al mismo grupo. Por ejemplo, el grupo *repAci2* es reconocido como GR20 (Fu et al., 2014; Lean & Yeo, 2017); así mismo, nuevas secuencias de estos genes permitieron adicionar nuevos GR, siendo añadido el GR23 el año 2017, en donde además se han implementado nuevos porcentajes de identidad en las proteínas de los GR ya establecidos, lo que permite diferenciarlos de manera más precisa. Por ejemplo, a partir del GR8 se logró identificar el GR23 (María M et al., 2017). En el año 2020, un estudio de plásmidos de *A. baumannii* aumentó el número de GR a 33 (Salgado-Camargo et al., 2020), y el 2021 se añadió uno más, el GR34. Ambos trabajos utilizaron un 74% de identidad en la secuencia de ADN (Liu et al., 2021). Estos y otros estudios, como los publicados por Mindlin et al., en el que se analizan plásmidos presentes en otras especies del género *Acinetobacter*, en este caso *Acinetobacter lwoffii* recuperadas del permafrost, (Mindlin et al., 2020), y el trabajo publicado por Salgado-Camargo et al.,

donde aplican clasificaciones basadas en GR con variaciones a lo propuesto inicialmente por Bertini, plantean el hecho de que los plásmidos varían por la pérdida de porciones significativas, específicamente en plásmidos pequeños o medianos, los que presentan módulos *dif*, planteándose el concepto de “linajes” de plásmidos (Salgado-Camargo et al., 2020). Los estudios mencionados anteriormente se han desarrollado en un contexto en el cual la secuenciación estaba progresando a ser una tecnología masiva y mejorando gradualmente las limitaciones al momento de reconstruir un genoma de manera fidedigna (Lam et al., 2023). Con el desarrollo de nuevas tecnologías y el perfeccionamiento de las ya existentes hoy en día, existe información suficiente para el planteamiento de nuevas estrategias de tipificación y clasificación de plásmidos, siendo el grupo de Hamidian *et al* los que plantean en el año 2021 un sistema que permite la clasificación de los plásmidos de *A. baumannii* basados en comparación de las secuencias de genes de replicasas (*rep*) con una gran base de datos de secuencias recopiladas de GenBank (Lam et al., 2023), permitiendo una simplificación en la nomenclatura de los plásmidos de *Acinetobacter*. Esta clasificación propone 3 grandes familias: Rep1, que incluye la información de 13 plásmidos disponibles para esta asignación, la cual originalmente, según el trabajo de Bertini, correspondían a los GR14 y GR16 respectivamente, en donde según la información recopilada por Hamidian *et al*, fue posible reclasificarlos desde las familias R1-T1 hasta R1-T6 (Lam et al., 2023). En segundo lugar, se ha descrito la familia RepPriCT, originalmente, al igual que la familia anterior estaba representada por un único plásmido, clasificado según Bertini *et al* como GR6 (Aci6). Éstos son plásmidos generalmente relacionados a la diseminación del gen de carbapenemasa *bla*_{OXA-23}. En este nuevo esquema de clasificación se analizaron 107 plásmidos correspondientes a esta familia, de los cuales 97 corresponden a *repAci6*. Finalmente, la nueva clasificación incluye a la familia Rep3, los que corresponden a plásmidos que presentan Aci9, también señalado como *repM* (Dorsey et al., 2006). Esta familia corresponde a la más abundante, con una colección constituida por 382 secuencias de genes *rep*, los que se diferencian en 69 tipos

utilizando un 95% de identidad nucleotídica, de los cuales el tipo más predominantes es R3-T1. Además, estos plásmidos fueron originalmente clasificados como GR2 según Bertini *et al*, siendo actualmente reasignados como R3-T2, denominados como Aci1 y Aci2 (Lam et al., 2023).

Secuenciación y reconstrucción de plásmidos.

La clasificación de plásmidos basada en el análisis de las secuencias de replicones o estructuras relacionadas a la replicación y movilización son insuficientes para caracterizar un plásmido completamente, ya que no consideran estructuras relevantes de dichos EGMs. El estudio de estas características basadas en PCR son difíciles y lentas, representando un gran problema para el entendimiento de la epidemiología de ciertos linajes de plásmidos importantes. Sin embargo, con el paso de los años la secuenciación, la generación de bases de datos robustas y curadas, así como también la disponibilidad de herramientas bioinformáticas que permiten la anotación, ensamblaje y reconocimiento de EGMs desde datos de genomas completos de bacterias han favorecido de gran manera el estudio de plásmidos y su caracterización.

La metodología de secuenciación de mayor utilización corresponde a técnicas denominadas de segunda generación o NGS (del inglés *next generation sequencing*). Este tipo de metodologías permiten obtener secuencias de genomas completos de bacterias con muy bajos porcentajes de error, en donde, de manera general, se encuentran representadas principalmente por la plataforma Illumina®, que incluye una primera etapa generación de la biblioteca, en la cual se fragmenta el genoma bacteriano y luego se añaden los adaptadores. En una siguiente etapa, ocurre la ligación del material genético a

la superficie de las celdas mediante los adaptadores unidos anteriormente, y luego, gracias a la presencia de nucleótidos marcados, comienza un proceso de amplificación denominado “amplificación en puente”. Finalmente, se generan “clústeres” de secuenciación en cada una de las celdas, los cuales son analizados para obtener las secuencias (*raw reads*), las que corresponden a fragmentos pequeños de ADN bacteriano secuenciado, luego, estas deben ser ensambladas en “contigs”, los cuales se forman por la superposición de los “*short reads*” generados, produciendo finalmente secuencias ensambladas que son posible utilizar para análisis posteriores (Arredondo-Alonso et al., 2017). El desarrollo de tecnologías de secuenciación va de la mano con el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas que permiten el análisis de la información obtenida de estas metodologías. Específicamente, para el estudio de plásmidos existen *softwares* que permiten predecir la presencia de plásmidos, tales como como PlasmidFinder o cBar, o incluso algunas herramientas permiten reconstruir la secuencia completa del plásmido, como es el caso de Recycler, PlasmidSPAdes, PLACENT o MOB-suite (Arredondo-Alonso et al., 2017; Robertson & Nash, 2018), las cuales son constantemente actualizadas y comparadas entre sí para llegar a una mejor resolución de la estructura de plásmidos. En este contexto, MOB-suite corresponde a una herramienta de fácil utilización, la cual entrega resultados robustos al momento de predecir la estructura de un plásmido (Robertson & Nash, 2018). Para determinar la carga genética del plásmido a partir de datos de secuenciación, es necesario realizar la anotación de los genes presentes en los plásmidos, en donde existen herramientas tales como Bakta (Schwengers et al., 2021) o Prokka (Seemann, 2014), las cuales utilizan diferentes bases de datos para asignar correctamente el gen a la secuencia correspondiente, permitiendo hacer un análisis de los genes de resistencia, genes relacionados con la movilización, estabilidad y otros EGMs (Schwengers et al., 2021; Seemann, 2014). Finalmente, en el análisis de un plásmido se puede optar por herramientas de visualización que permitan representar los genes del plásmido facilitando el entendimiento del contexto genético de ciertos genes

codificados en el plásmido (Grant et al., 2023).

Con todas las herramientas disponibles, tanto la tipificación basada en la variedad de secuencias de genes *rep* propuesta por Lam y Hamidian, sumado a la disponibilidad y acceso a la secuenciación de genomas completos y a herramientas bioinformáticas para predecir la estructura de plásmidos, es que hoy en día es posible realizar análisis lo suficientemente profundos para entender las características de linajes de plásmidos de resistencia de alto riesgo, con la finalidad de mejorar el conocimiento de la evolución de la resistencia en *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, el cual es considerado como un patógeno prioritario por la OMS.

Problema de investigación.

Finalmente, con los antecedentes planteados *Acinetobacter baumannii* está posicionado como un patógeno crítico para el cual es necesario generar y profundizar en el conocimiento de sus características que lo posicionan como tal, esto sumado al contexto particular de nuestra región geográfica, en la cual se presenta una diversidad en términos de población de esta bacteria que difiere a la del resto del planeta hacen necesario considerar la posibilidad de que estos aislados presenten elementos genéticos móviles con diferentes características las que podrían favorecer a la mantención y diseminación de genes de resistencia a carbapenémicos además de otros genes que podrían favorecer el éxito como patógeno de este tipo de bacterias.

CAPÍTULO IV: HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Hipótesis

Las carbapenemasas adquiridas del tipo OXA presentes en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas en Chile, se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos.

Objetivo General

Caracterizar los plásmidos portadores de carbapenemasas adquiridas tipo OXA, en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos.

Objetivos Específicos

1.- Caracterizar los plásmidos portadores de carbapenemasas adquiridas tipo OXA en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos.

2.- Determinar la capacidad de diseminación de los plásmidos portadores de carbapenemasas adquiridas tipo OXA entre cepas de *A. baumannii* aisladas en hospitales chilenos.

CAPÍTULO V: MATERIALES Y METODOS

Cepas de Estudio

Las cepas de *A. baumannii* incluidas en este trabajo provienen de procesos infecciosos en humanos, las cuales se encuentran almacenadas en el biorepositorio del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA) del departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Específicamente, las cepas se encuentran almacenadas a -80° C en una mezcla de caldo de cultivo y glicerol (50% v/v) en relación 2:1. Se incluyeron 32 cepas, las cuales fueron aisladas en distintos recintos hospitalarios del país recuperadas entre los años 2000 y 2022, como se muestra en la **tabla 2**.

Tabla 2: Cepas de estudio

Cepa	Año	Región	Hospital
A90-41	1990	Valparaíso	H. Valparaíso
A93-03	1993	Bíobío	HGGB
A97-11	1997	Bíobío	HGGB
A362	2007	Metropolitana	PUC
A375	2008	Metropolitana	H. Barros Luco
A353	2009	La Araucanía	H.R. Temuco
A356	2009	La Araucanía	H. R. Temuco
A462	2011	Metropolitana	H.U. Asistencia Pública
A562	2011	La Serena	La Serena

A541	2015	La Araucanía	H. R. Temuco
A559	2015	Conquimbo	H. Conquimbo
A675	2016	Los Lagos	H. Los Lagos
A676	2016	Los Lagos	H. Los Lagos
A658	2017	Metropolitana	H. Sotero del Rio
A758	2017	Metropolitana	H.U. Asistencia Pública
A821	2018	Maule	H.R. Talca
A865	2018	Maule	H.R. Talca
A872	2019	La Araucanía	H.R. Temuco
A882	2019	Bíobío	H. Higuera
A888	2019	Metropolitana	H. Padre Hurtado
A891	2019	Metropolitana	H. Padre Hurtado
A892	2019	Metropolitana	H. Padre Hurtado
A906	2020	La Araucanía	H.R. Temuco
A907	2020	La Araucanía	H.R. Temuco
A914	2020	Bíobío	HGGB
A917	2020	Bíobío	HGGB
A903	2021	Bíobío	HGGB
A904	2021	Bíobío	HGGB
A905	2021	Bíobío	HGGB
A913	2021	Bíobío	HGGB
A921	2021	Maule	H.R. Talca
A922	2021	Maule	H.R. Talca

Determinación de los perfiles de susceptibilidad a antibióticos

La determinación de los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de las cepas se realizó mediante la metodología de difusión en agar descrita por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2024). Se utilizaron discos de antibióticos (Oxoid Ltd. Basingstoke, UK) de los siguientes antibióticos: imipenem (IPM, 10µg), meropenem (MEM, 10µg), cefepima (FEP, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), ceftazidima (CAZ, 30µg), levofloxacin (LEV, 5µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), piperacilina/tazobactam (TZP, 100/10µg), ampicilina/sulbactam (SAM, 20µg), gentamicina (GEN, 10µg), amikacina (AMK, 30µg), sulfametoxazol-trimetoprim (STX, 23,75/1,25µg) y tetraciclina (TET, 30µg).

Extracción de ADN de las cepas bacterianas

La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cada cepa se realizó utilizando la matriz InstaGene™ (Bio Rad®) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Específicamente, la extracción se realizó a partir de cultivos en placas de agar tripticasa de soya (Oxoid®), desde donde se seleccionaron 2 o 3 colonias bacterianas y se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. Luego, los tubos se centrifugaron a 10,000-12,000 rpm por un min, se eliminó el sobrenadante, y posteriormente se le adicionaron 200µl de InstaGene™ Matrix al sedimento, para luego incubar los tubos a 56 °C por 30 min. Una vez finalizada la incubación, los tubos se sometieron a agitación por un *vortex* por 10 s y luego se incubaron a 100°C por 8 min. Luego, se sometieron nuevamente a un *vórtex* por 10 s y los tubos se centrifugaron a 10,000-12,000 rpm por 3 min. Finalmente, se almacenaron los sobrenadantes resultantes -20°C para ser utilizado en los futuros experimentos.

Detección de carbapenemasas mediante PCR

La detección de carbapenemasas se realizó mediante PCR múltiple según la metodología propuesta por Higgins *et al.* (Higgins et al., 2010), a través de la cual es posible pesquisar los genes de **bla**_{OXA-51} (producto de 353pb, partidores: 5'TAATGCTTTGATCGGCCTTG3' y 5'TGGATTGCACTTCATCTTGG3'), **bla**_{OXA-23} (producto de 501pb, partidores: 5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA3' y 5'ATTCTGACCGCATTTCAT3'), **bla**_{OXA-24} (producto de 246pb, partidores: 5'GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA3' y 5'AGTTGAGCGAAAAGGGGATT3'), **bla**_{OXA-58} (producto de 599pb, partidores: 5'AAGTATTGGGGCTTGTGCTG3' y 5'CCCCTCTGCGCTCTACATAC3') y **bla**_{OXA-143} (producto de 149pb, partidores: 5'TGGCACTTTCAGCAGTTCCT3' y 5'TAATCTTGAGGGGGCCAACC3') (Higgins et al., 2010; Woodford et al., 2006). Los partidores fueron evaluados de forma individual utilizando cepas control y posteriormente en formato múltiple. Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial a 94°C por 5 min, luego 30 ciclos de 94°C por 25s, 52°C por 40s y 72°C por 50s, y una elongación final de 72°C por 6 min. Luego, los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (Lafken, Fermelo Biotec) en geles de agarosa al 1% p/v y visualizados con un transiluminador UV (UVITEC®).

Secuenciación del genoma completo de las cepas bacterianas.

Se seleccionaron 15 cepas portadoras de genes de carbapenemasas adquiridas de las familias *bla*_{OXA-23-like} y *bla*_{OXA-58-like} (8 y 7 respectivamente), fueron secuenciadas mediante la plataforma Illumina NextSeq en la empresa SeqCenter, ubicada en Pittsburgh, Estados Unidos, desde donde se obtuvieron las lecturas “crudas” en formato fastq (2x151pb) de cada muestra, junto con la información de la calidad de las lecturas.

Ensamblaje del genoma

Los genomas fueron ensamblados *de novo*. Para esto, se utilizó el ensamblador Unicycler disponible en la plataforma del *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center* (BV-BRC) (www.bv-brc.org). Los parámetros empleados para el proceso de ensamblaje corresponden a los parámetros ofrecidos de manera “default” o recomendados ofrecidos por la plataforma BV-BRC, en la cual como principal motor de ensamblaje se utiliza Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>), además se consideró el proceso de “Trimming” previo al ensamblaje utilizando TrimGalore (Krueger, 2012), normalización de los reads y generando contigs con un mínimo de 300pb de largo, además de iteraciones de “Racon y Pilon”, tanto Racon como Pilon consideran los contigs, las lecturas asignadas a esos contigs y buscan discrepancias en el ensamblaje, cuando haya una discrepancia, se corrige el ensamblaje de ser necesario, estos parámetros son los recomendados por la plataforma [bv-brc.org](http://www.bv-brc.org), en su apartado de ensamblaje de genomas (<https://www.bv-brc.org/app/Assembly2>) (Olson et al., 2023).

Análisis *in silico* de los genomas bacterianos

El análisis *in silico* de los genomas ensamblados se realizó con diferentes herramientas bioinformáticas con el objetivo de caracterizar los genomas incluidos. En primer lugar, se determinaron los secuenciotipos (STs) mediante la plataforma PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity, <https://pubmlst.org/>) (Jolley et al., 2018). Adicionalmente, se identificaron los genes de resistencia mediante CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, <https://card.mcmaster.ca/home>) (Alcock et al., 2023), Resfinder v4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) (Bortolaia et al., 2020), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Camacho et al., 2009). Para lo anterior, se utilizó ABRicate v1.0.1 disponible en la plataforma Galaxy Australia (<https://usegalaxy.org.au/>) para analizar los genomas bacterianos (Seemann, T. (2019). ABRicate: <https://github.com/tseemann/abricate>), utilizando la base de datos de NCBI (Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database). Todas estas plataformas fueron comparadas entre sí para verificar los genes de resistencia encontrados. Adicionalmente, se emplearon diversas bases de datos para la búsqueda de EGM como transposones (Tn) y secuencias de inserción (Is) en ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr/howto.php>) (Siguier et al., 2006), así como también mediante el uso de bases de datos curadas, tales como MobileOG-db (Brown et al., 2022) la cual está disponible en la plataforma de Proksee (Grant et al., 2023) y mediante MobileElement Finder (Johansson et al., 2021), disponible en la plataforma del Center for Genomic Epidemiology (CGE) (<https://www.genomicepidemiology.org/>) (Johansson et al., 2021).

Análisis de plásmidos

Identificación de plásmidos

La pesquisa de plásmidos se realizó a partir de los genomas ensamblados utilizando mediante diversas herramientas bioinformáticas disponibles en la plataforma Galaxy Australia (<https://usegalaxy.org.au/>). Específicamente, se utilizó la herramienta MOB- suite versión 3.0.3 (Robertson & Nash, 2018), la que incluye MOB-*recon* y MOB-*typer* para la reconstrucción de plásmidos y la predicción de movilidad con parámetros recomendados por la aplicación, en el caso de MOB-*recon* compara los contigs presentes en el archivo fasta del genoma completo mediante *blast* con bases de datos de genes de relaxasas y replicones filtrando en base a su porcentajes de cobertura e identidad, además de generar un score para evitar el solapamiento de diferentes secuencias seleccionado aquellas que presenten los valores más altos, los contigs seleccionados de este proceso son considerados como contigs candidatos para pertenecer a un plásmido, simultáneamente es pesquisada la presencia de elementos genéticos repetidos como IS mediante bases de dato como GenBank e ISfinder; finalmente los contigs seleccionados son agregados en base a comparaciones con bases de datos de plásmidos de referencia asignando un contig a un único plásmido o al cromosoma, siendo esta una limitación debido a que los genes con múltiples copias solo serán asignados a una única estructura, resultado en archivos tipo FASTA, que contienen todos los contigs asignados a un único plásmido, por otro lado, MOB-*typer* tipifica el replicon de manera similar a plataformas como PlasmidFinder, pero considerando relaxasas, oriT y además de proteínas que cumplan funciones de formación del par conjugante, clasificando como plásmidos “conjugativos” a aquellos que presenten al menos un gen de relaxasa y el arsenal de proteínas del par conjugante (proteínas Tra), por otro lado, categoriza como plásmidos “movilizables” a aquellos que presenten genes de relaxasas y una secuencia tipo oriT, pero a diferencia de la anterior clasificación, estos carecen de las proteínas del par

conjugante; finalmente esta herramienta clasifica como “no movilizables” aquellos plásmidos que no presenten ninguna de las características anteriormente mencionadas, el flujograma de trabajo de estas herramientas se aprecia en **anexo 2** (Robertson & Nash, 2018). Resultando en la obtención de nuevos archivos fasta pertenecientes a las secuencias de los diferentes plásmidos resueltos por esta metodología.

Confirmación de genes de carbapenemasas

Los archivos correspondientes a plásmidos obtenidos del proceso de **“Identificación de plásmidos”**, se les aplicara nuevamente la metodología de búsquedas de genes de resistencia para seleccionar solo aquellos plásmidos que presenten genes de carbapenemasas, al igual que se hizo con el cromosoma completo según la metodología de **“Análisis del genoma”** anteriormente descrita. Resultando en la obtención de secuencias de plásmidos portadores de carbapenemasas del tipo adquiridas los cuales serán el eje central de este trabajo a las cuales se les aplicara las siguientes metodologías.

Análisis, anotación y visualización de plásmidos

Anotación de genes de plásmidos y visualización

Los plásmidos estudiados que presentaron carbapenemasas adquiridas del tipo OXA se anotaron mediante diversas plataformas, tales como Bakta v 1.7.0 (Schwengers et al., 2021) (bakta.computational.bio) (Schwengers et al., 2021) Prokka v 1.14.6 (Seemann, 2014). Además, se utilizó una base de datos curada específicamente para la búsqueda y anotación de genes relacionados con elementos genéticos móviles llamada mobileOG-db v1.1.2 (Brown et al., 2022). Complementariamente, se utilizó BLAST para la asignación del tipo de replicasa presente en estos plásmidos utilizando como

secuencia objetivo los contigs identificados como plásmidos a partir de MOB-recon y como secuencia “query” se utilizaron las secuencias de replicasas propuestas por Lam *et al* (Camacho *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2023). Finalmente, todos los genes anotados presentes en los plásmidos fueron ordenados y visualizados en la plataforma Proksee (<https://proksee.ca/>), (Grant *et al.*, 2023).

Comparación con plásmidos circularizados

Las secuencias de los plásmidos identificados anteriormente se compararon con secuencias plasmídicas previamente depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y en la base de datos de plásmidos o PLSDB v2021_06_23_v2 (Galata *et al.*, 2019) utilizando BLAST para la comparación de secuencias. Posteriormente, se compararon los plásmidos de las bases de datos con los obtenidos en este trabajo mediante las herramientas Easyfig 2.2.2 y Clinker v0.0.23 (Gilchrist & Chooi, 2021; Sullivan *et al.*, 2011).

Ensayos de conjugación

Se realizaron ensayos de conjugación para evaluar la capacidad de movilización y transferencia de los plásmidos portadores de carbapenemasas adquiridas tipo OXA entre cepas de *Acinetobacter baumannii in vitro*. Para esto, se seleccionaron 6 cepas de *A. baumannii* portadoras de genes de carbapenemasas tipo OXA (A375, A462, A891, A892, A903 y A922), específicamente *bla*_{oxa-23} y *bla*_{OXA-58}, en plásmidos con genes *rep* Rp-T1 y R3-T14 respectivamente y 4 cepas de *A. baumannii* susceptibles a carbapenémicos (ATCC 19606, UCO565, A90-03, A 90-41). Para ambos grupos de cepas se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a imipenem o meropenem y rifampicina, los cuales corresponden a los antibióticos utilizados en las placas de selección, esta determinación se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI.

Selección de cepas receptoras mutantes resistentes a rifampicina

Las cepas receptoras que se emplearon en el ensayo de conjugación corresponderán a cepas inicialmente susceptibles a carbapenémicos (imipenem y meropenem) de la colección de cepas del LIAA (CMI menor o igual a 2 µg/ml a carbapenémicos), específicamente, se usaron 4 cepas de *Acinetobacter baumannii* (ATCC19606, UCO565, A93-03, A90-41), a las cuales se les determinó la CMI tanto a rifampicina como a carbapenémicos mediante microdilución en caldo según lo recomendado por el M100 CLSI. En el caso de las cepas que presentaron una CMI baja a rifampicina se sometieron a un proceso de cultivos sucesivos con concentraciones crecientes de rifampicina utilizando una microplaca de 96 pocillos con concentraciones desde 0 a 512 µg/ml de rifampicina (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512), en este ensayo se empleó como inóculo de cada pocillo una re suspensión en relación 1:3 del pocillo correspondiente a la concentración más alta de rifampicina en la que se evidenciara crecimiento bacteriano (turbidez), es decir, por ejemplo, si la CMI el día 1 fue de 4 µg/ml, se inóculó con una solución de 1:3 del pocillo correspondiente a 2 µg/ml y así sucesivamente hasta seleccionar cepas que presentaran una CMI elevada al antibiótico.

Ensayo de conjugación en medio líquido

El protocolo de conjugación utilizado consistió en sembrar el par conjugante por separado en placas de agar nutritivo (Agar LB o Agar tripticasa de soya) por 18-24 h a 37°C. Posteriormente, se selecciona una colonia de cada cepa y se traspasaron a matraces Erlenmeyer de 50 ml con 20 ml de caldo LB los cuales se incubaron a 37°C con agitación

a 170 rpm por 18 h. Adicionalmente, en un nuevo matraz Erlenmeyer con 20ml de caldo LB se agregaron 500 µl de la cepa dadora y 100 µl de la cepa receptora, para luego incubar esta mezcla por 18 h a 37°C sin agitación. Finalmente, se sembraron 100 µl del matraz de conjugación en placas de agar Müller-Hinton suplementadas con 2 µg/ml de meropenem y 256 µg/ml de rifampicina, las cuales fueron incubadas por 18-24 h a 37°C. Posteriormente se seleccionan diferentes colonias que hayan crecido en las diferentes placas y se procedió a realizar un subcultivo en placas de agar LB sin antibióticos, para finalmente realizar la extracción de ADN de estas colonias y confirmar la presencia de genes de carbapenemasas adquiridas y la relación genética entre la cepa dadora, receptora y transconjugante mediante ERIC-PCR para comprobar su isogenicidad (Vila et al., 1996)

Análisis de resultados de conjugación mediante ERIC-PCR y PCR

Se emplearon los mismos partidores utilizados en el protocolo de PCR múltiple para la búsqueda de *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58} dependiendo del ensayo de conjugación, además, se realizaron estudios de ERIC-PCR para el análisis de relaciones genéticas en las cepas dadoras, receptoras y transconjugantes. Las condiciones de amplificación para los partidores 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3' y 5'AAGTAAGTGACTGGGGGT3' fue una amplificación de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 65°C por 8 min, y una extensión final a 65°C por 16 min (Vila et al., 1996).

CAPÍTULO V: RESULTADOS

Perfiles de resistencia a los antibióticos

Se determinaron los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas incluidas en este estudio, la cual se realizó mediante el método de Kirby-Bauer. Se obtuvo que 26/32 (81%) cepas fueron resistentes a carbapenémicos (imipenem y meropenem), como se observa en la **Figura 4**, siendo estas las seleccionadas para la búsqueda de genes de carbapenemasas tipo OXA.

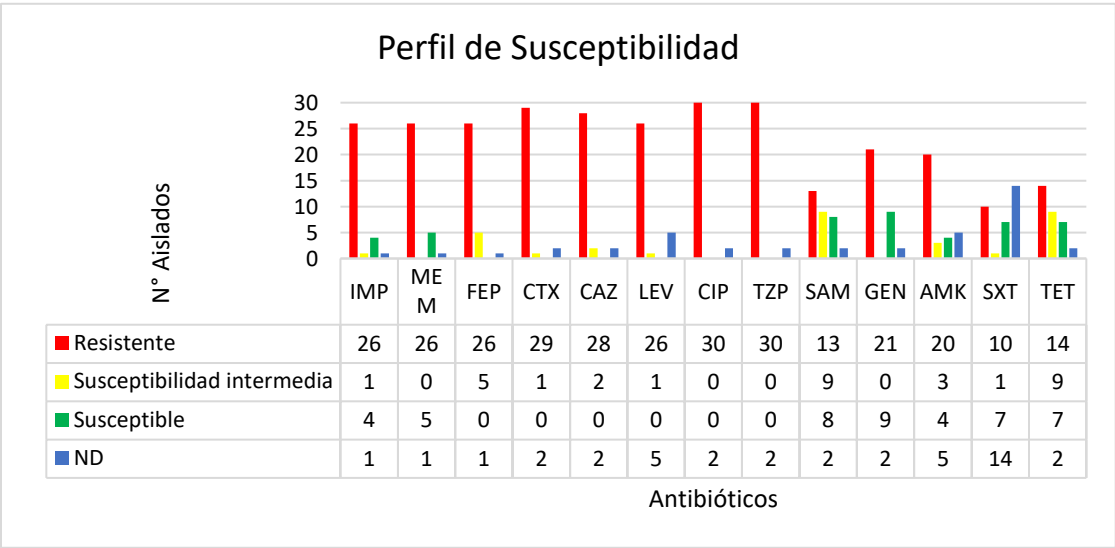


Figura 4: Perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las 32 cepas de *A. baumannii*.

Identificación de genes carbapenemasas tipo OXA

La pesquisa de genes de carbapenemasas tipo OXA se realizó mediante PCR-múltiple a todas las cepas no susceptibles a carbapenémicos, las que corresponden a 26 cepas resistentes y una cepa con susceptibilidad intermedia a imipenem y susceptible a meropenem. De estas, 15 presentaron genes de carbapenemasas adquiridas; específicamente 8 presentaron *bla*_{OXA-23-like} y 7 portaban *bla*_{OXA-58-like}. Respecto al resto de cepas resistentes (12/27), el mecanismo de resistencia a carbapenémicos correspondió a la asociación IS*Aba1*/OXA-51-like, en el cual la IS favorece la expresión de la carbapenemasa de la familia OXA-51, lo que otorga un fenotipo resistente a carbapenémicos. Adicionalmente, las 15 cepas portadoras de OXA adquiridas (OXAad) fueron secuenciadas en para este trabajo.

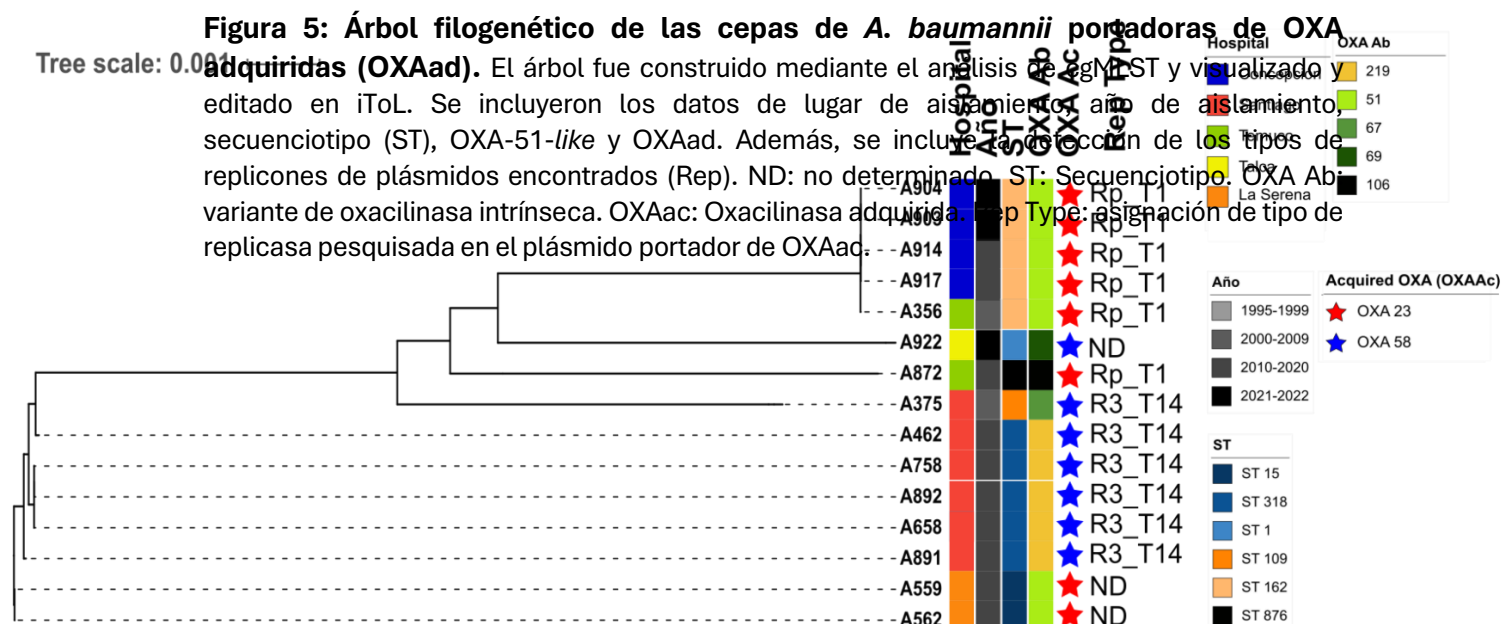
Secuenciación del genoma completo y análisis de secuencias

Los 15 genomas de las cepas de *A. baumannii* portadoras de carbapenemasas OXAad fueron analizados por diversas plataformas y bases datos como se indica en la metodología. A partir de este análisis, fue posible confirmar la portación de genes de resistencia, en donde el 100% de las cepas portaba el gen de resistencia a carbapenémicos encontrado por PCR-múltiple, mostrando una congruencia del 100% entre ambas técnicas. Por otro lado, fue posible identificar la variante de OXA-51 presente en estas cepas, además de la asignación del ST, correspondiendo a 6 STs diferentes, 5 cepas del ST318, 4 cepas del ST162, 2 cepas del ST1, 2 cepas de ST15, 1 cepa de ST109 y 1 cepa de ST876, tal como se muestra en la **Figura 5**, en donde además se agregaron los datos de fecha de aislamiento y lugar de procedencia, así como también el resultado del árbol filogenético de las cepas. Por otro lado, se pudo confirmar la presencia de otros

genes de resistencia a antibióticos, como genes de resistencia a aminoglucósidos, sulfonamidas, cefalosporinas y β -lactámicos, entre otros, lo cual se resume en la **Tabla 2**.

Tabla 3: Genes de resistencia a los antibióticos pesquisados a partir de las secuencias de los genomas completos de las cepas de estudio.

Cepas	Carbapenémicos		Aminoglucósidos	Sulfonamidas	Cefalosporinas	Penicilinas	Otros
	OXA-51-like	OXAad					
A-356	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(3'')-lia</i> , <i>aph(3')-Via</i>		<i>bla</i> _{ADC-234}		
A-375	<i>bla</i> _{OXA-67}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ant(2'')-la</i> , <i>aac(3)-lie</i> , <i>aph(6)-ld</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>ant(3'')-lia</i> , <i>aph(3')-Via</i>	<i>sul2</i>			<i>sat2</i> , <i>catB2</i> , <i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i>
A-462	<i>bla</i> _{OXA-219}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ant(3'')-lia</i> , <i>aph(3')-Vla</i>		<i>bla</i> _{ADC-6}		
A-559	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(3'')-lia</i>		<i>bla</i> _{ADC-6}		
A-562	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(3'')-lia</i>		<i>bla</i> _{ADC-6}		
A-658	<i>bla</i> _{OXA-219}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ant(3'')-lia</i> , <i>aph(3')-Via</i>		<i>bla</i> _{ADC-6}		
A-758	<i>bla</i> _{OXA-219}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ant(3'')-lla</i> , <i>aac(3)-lle</i> , <i>aph(3')-Vla</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> _{ADC-6}	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>catA2</i>
A-872	<i>bla</i> _{OXA-103}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(3'')-lia</i>		<i>bla</i> _{ADC-105}		
A-891	<i>bla</i> _{OXA-219}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ant(3'')-lla</i> , <i>aph(3')-Vla</i>		<i>bla</i> _{ADC-6}		
A-892	<i>bla</i> _{OXA-219}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>ant(3'')-lla</i> , <i>aac(3)-lle</i> , <i>aph(3')-Vla</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> _{ADC-6}	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>catA2</i>
A-903	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>aph(3')-Via</i> , <i>ant(3'')-lia</i> , <i>ant(2'')-la</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> _{ADC-234}		<i>mph(E)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>floR</i>
A-904	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(2'')-la</i> , <i>aph(3')-Via</i> , <i>ant(3'')-lla</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> _{ADC-234}		<i>floR</i>
A-914	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(2'')-la</i> , <i>aph(3')-Via</i> , <i>ant(3'')-lla</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> _{ADC-234}		<i>floR</i>
A-917	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(2'')-la</i> , <i>ant(3'')-lia</i> , <i>aph(3')-Via</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> _{ADC-234}		<i>floR</i>
A-922	<i>bla</i> _{OXA-69}	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>aac(3)-lle</i> , <i>ant(3'')-lia</i>		<i>bla</i> _{ADC-6}	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>msr(E)</i> , <i>mph(E)</i>



Reconstrucción de plásmidos portadores de OXAad

La búsqueda de plásmidos portadores de OXAad en las secuencias de los genomas de las 15 cepas se realizó mediante MOB-RECON en la plataforma Galaxy Australia (<https://usegalaxy.org.au>). Por cada cepa procesada en esta herramienta se obtuvo como resultado la resolución de diversos plásmidos descritos en la **Tabla 3**. De las 15 cepas portadoras de *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58} que fueron secuenciadas, solo en 12 se logró resolver un plásmido portador del gen de OXAad con la correspondiente asignación de Rep-type. Por otro lado, en todas las cepas estudiadas han sido resueltos otros plásmidos, en donde los plásmidos portadores de OXA-23 presentan un tamaño aproximado promedio de 78kb correspondiente generalmente a 9 contigs. Además, los plásmidos portadores de OXA-58 presentaron un tamaño aproximado de 19kb

correspondientes generalmente a 5 contigs. La cantidad de plásmidos resueltos por el *software* varia en cada cepa, siendo aquellas con menor número de plásmidos las cepas A356, A462, A658, A914 y A917, con solo 4 plásmidos cada una. También, fue posible determinar la presencia de múltiples plásmidos en una cepa, como en el caso de la cepa A922, la que presenta 9 plásmidos, tal como se puede apreciar en la **Tabla 3**. Posteriormente, se predijo la capacidad de movilización de los plásmidos portadores de *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58}, siendo los primeros portadores de relaxasas tipo MOB-F y conjugativos según MOB-Typer. En el caso de los plásmidos portadores de *bla*_{OXA-58}, estos portan relaxasas del tipo MOB-Q y son caracterizados como plásmidos movilizables, sin embargo, en análisis de genes hecho con la herramienta Bakta (Schwengers et al., 2021) fue posible pesquisar otros genes relacionados con movilización. Específicamente, para el caso de los plásmidos portadores de OXA-23, esta herramienta reconoce la presencia de varios genes *tra* los cuales se pueden apreciar en la **Tabla 5**. En el caso de los plásmidos portadores de OXA-58, estos presentan genes relacionados con movilización, específicamente *mobC* y *mobA-mobL*, sin embargo, no presentan los genes *tra*, además de otros genes en común, los cuales están resumidos en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Plásmidos detectados *in siico* presentes en las cepas de *A. baumannii* portadoras de OXAad.

Cepas	Plásmidos resueltos por MOB-RECON								
	Plásmidos portadores de OXAad	Otros plásmidos							
A-356	pAB082 A356 OXA23Rp-T1	plasmid_AB338_A356	plasmid_AE271_A356	plasmid_AE272_A356					
A-375	pAC161 A375 OXA58R3-T14	plasmid_AB008	plasmid_AB595	plasmid_AC969_A375_R3_r3-T28	plasmid_AD096	plasmid_AE271	plasmid_AE271	plasmid_AF831_A375_R3_r3-T18	
A-462	pAC161 A462 OXA58R3-T14	plasmid_AD096_A462	plasmid_AE271 A462	plasmid_AE272_A462					
A-559	ND*	pAC161 A599_R3_r3-T14	plasmid_AC715 A599_R3_r3-T13	plasmid_AE271	plasmid_AE272	plasmid_AE689			
A-562	ND*	plasmid_AB338	plasmid_AC161 A562_R3_r3-T14	plasmid_AE271	plasmid_AE272	plasmid_AH171			
A-658	pAC161 A658 OXA58R3-T14	plasmid_AD096	plasmid_AE271	plasmid_AE272					
A-758	pAC161 A758 OXA58R3-T14	plasmid_AC716	plasmid_AD096	plasmid_AE271	plasmid_AE272				
A-872	pAB082 A872 OXA23 RP-T1	plasmid_AB114	plasmid_AC161 A872_R3_r3-T14	plasmid_AD096	plasmid_AE271	plasmid_AE272			
A-891	pAC161 A891 OXA58R3-T14	plasmid_AE271	plasmid_AE272						
A-892	pAC161 A892 OXA58R3-T14	plasmid_AC716	plasmid_AD096	plasmid_AE271	plasmid_AE272				
A-903	pAB082 A903 OXA23RP-T1	plasmid_AB338	plasmid_AB829	plasmid_AE271	plasmid_AE272				
A-904	pAB082 A904 OXA23RP-T1	plasmid_AB338	plasmid_AC715	plasmid_AE272	plasmid_AH171	plasmid_novel_			
A-914	pAB082 A914 OXA23RP-T1	plasmid_AB338	plasmid_AE272	plasmid_novel					
A-917	pAB082 A917 OXA23RP-T1	plasmid_AB338_A917_R3_r3-T13	plasmid_AE272	plasmid_novel					
A-922	plasmid_novel_A922_OXA58**	plasmid_AC239_A922_mphE, msrE	plasmid_AC239 A922 mphE, msrE	plasmid_AD642_A922	plasmid_AD745 A922 mobC mobL repB relE	plasmid_AE271_A922	plasmid_AE272_A922	plasmid_AF831_A922	plasmid_AF972_A922

–ND*: No se encontraron plásmidos portadores del gen de OXAad, **: Plásmidos sin *Rep-type* definido por la aproximación de Hamidian et al.

Tabla 5: Genes relevantes presentes en los plásmidos OXA-58/R3-T14.

Plásmidos OXA-58/R3-T14						
Genes	pAC161 A375	pAC161 A462	pAC161 A658	pAC161 A758	pAC161 A891	pAC161 A892
Resistencia	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-58} , <i>aph(3)</i> <i>Vla</i>	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-58} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac(3)-IIc</i>	<i>bla</i> _{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-58} , <i>bla</i> _{TEM-1} , , <i>aac(3)-IIc</i>
IS	ISAb _a 125, ISAb _a 3, IS66 family	ISAb _a 125, ISAb _a 3, IS26 family IS66 family	ISAb _a 125, ISAb _a 3, IS26 family, IS66 family	ISAb _a 3, IS26 family, IS66 family	ISAb _a 125, ISAb _a 3, IS26 family, IS66 family	ISAb _a 125, ISAb _a 3, IS26 family, IS66 family
Transferencia/ movilización	MobA-MobL,					
Estabilidad	Sistemas toxina-antitoxina BrnT/BrnA, proteína de membrana externa TonB y septicolisina, proteínas de unión ADN, Csp (<i>del inglés "Cold Shock Protein"</i>), Transposasas, toxina-antitoxina HigBA, familia de proteínas NadS, regulador transcripcional AraC1, LysE					

Tabla 6: Genes de resistencia, secuencias de inserción (IS) y genes relacionados con conjugación presentes en los plásmidos OXA-23/RP-T1

Plásmidos OXA-23/Rp-T1							
Genes		pAB082 A356	pAB082 A872	pAB082 A903	pAB082 A904	pAB082 A914	pAB082 A917
Genes de resistencia		<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>aph(3')-VIa</i> , <i>ant (2'')</i> <i>la</i>	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>aph(3) Via</i>	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>aph(3)</i> <i>Via</i>	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>aph(3) Via</i>
IS		IS17, ISAb _a 125	IS26, ISAb _a 17, IS26	IS26, ISAb _a 125, ISAb _a 17	IS26, ISAb _a 17	IS26, ISAb _a 17, ISAb _a 125	IS26, ISAb _a 125, ISAb _a 17
Conjugación/ transferencia	Genes <i>Tra</i>	traA, traD, traE, traK, traB, traV, traC, traW, traU, traN, traF, traH, traG					
	Otros	Relaxasa recD2, pilT, TrbC, noc regulador transcripcional	Relaxasa recD2, pilT, TrbC, noc regulador transcripcional	Relaxasa recD2, pilT, TrbC, noc regulador transcripcional	Relaxasa recD2, pilT, TrbC, noc regulador transcripcional	Relaxasa recD2, pilT, TrbC, noc/parB regulador transcripcional	relaxasa recD2, pilT, TrbC, noc/parB regulador transcripcional

Anotación y visualización de plásmidos

Se realizó la anotación de genes presentes en los contigs asociados a plásmidos por parte de MOB-Recon. Estos fueron anotados mediante Bakta (Schwengers et al., 2021), Prokka (Seemann, 2014) y NCBI, en donde los contigs anotados se visualizaron mediante la plataforma Proksee (Grant et al., 2023). Los plásmidos caracterizados se encuentran representados en las **Figuras 6-17**, en donde es posible observar de mejor manera el contexto genético en el que se encuentran insertos los genes de resistencia a carbapenémicos (*bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58}) además de otros genes de resistencia. En todos los plásmidos generados podemos encontrar IS generalmente flanqueando a los genes de *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58} siendo estas principalmente IS17 y ISAb_a17 para OXA-23 y ISAb_a125, ISAb_a3 y IS26 para OXA-58.

Plásmidos portadores de OXA-58 y replicasa R3-T14

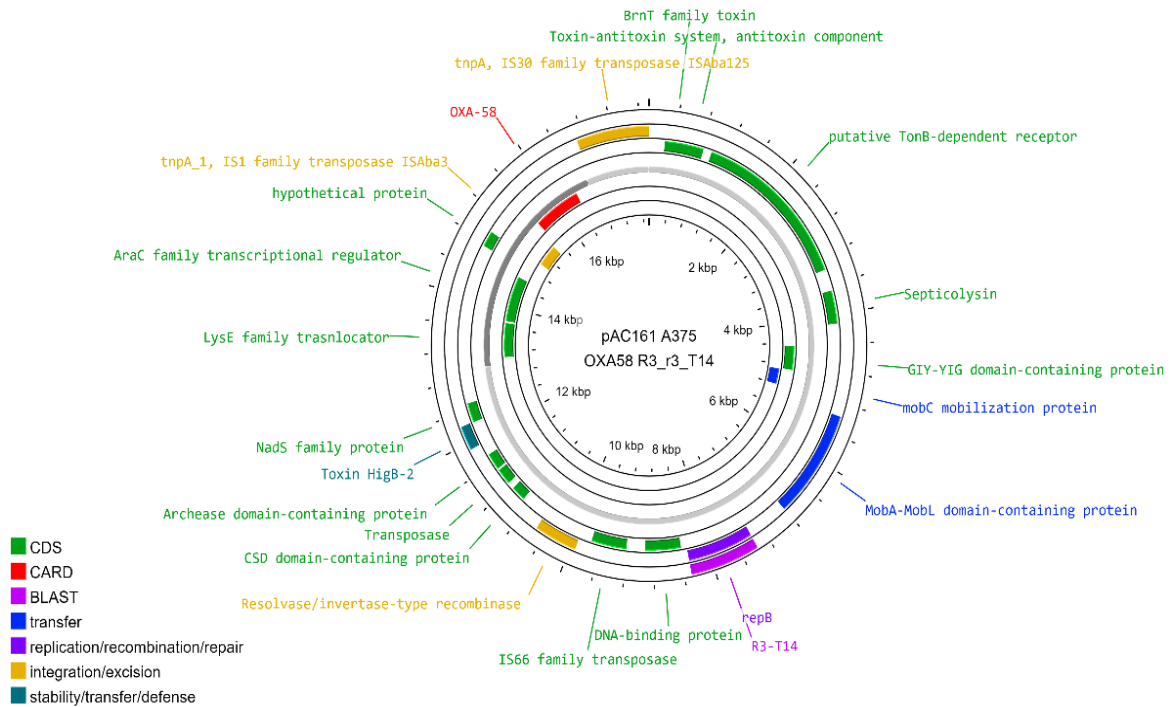


Figura 6: plásmido portador del gen *bla*_{OXA-58} de la cepa A375

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **R3-T14**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación.

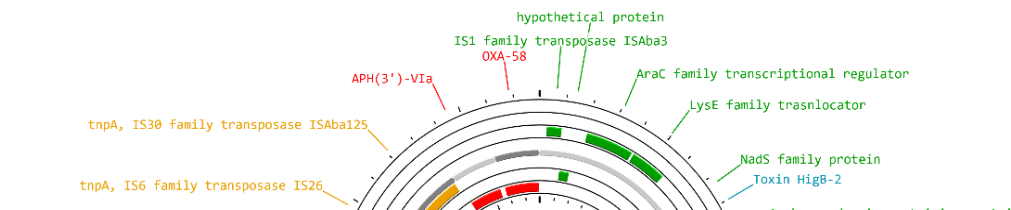
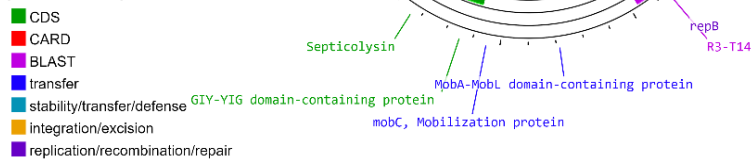


Figura 7: plásmido portador del gen *bla_{oxa-58}* de la cepa A462

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **R3-T14**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación.



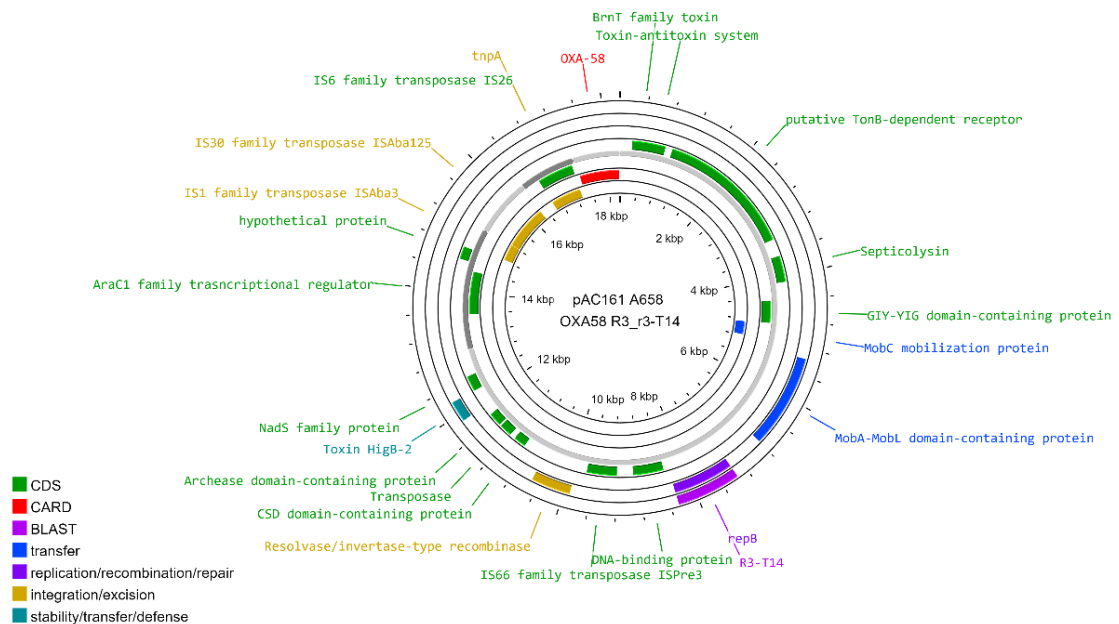


Figura 8: plásmido portador del gen *bla*_{OXA-58} de la cepa A658

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **R3-T14**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación

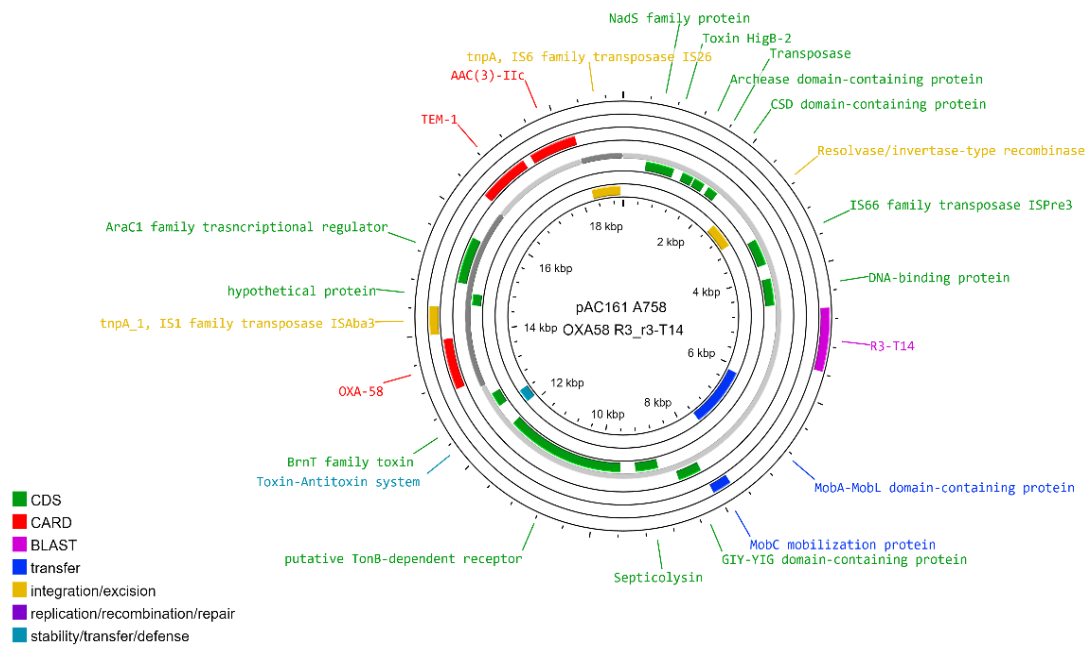


Figura 9: plásmido portador del gen *bla*_{oxa-58} de la cepa A758

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **R3-T14**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación

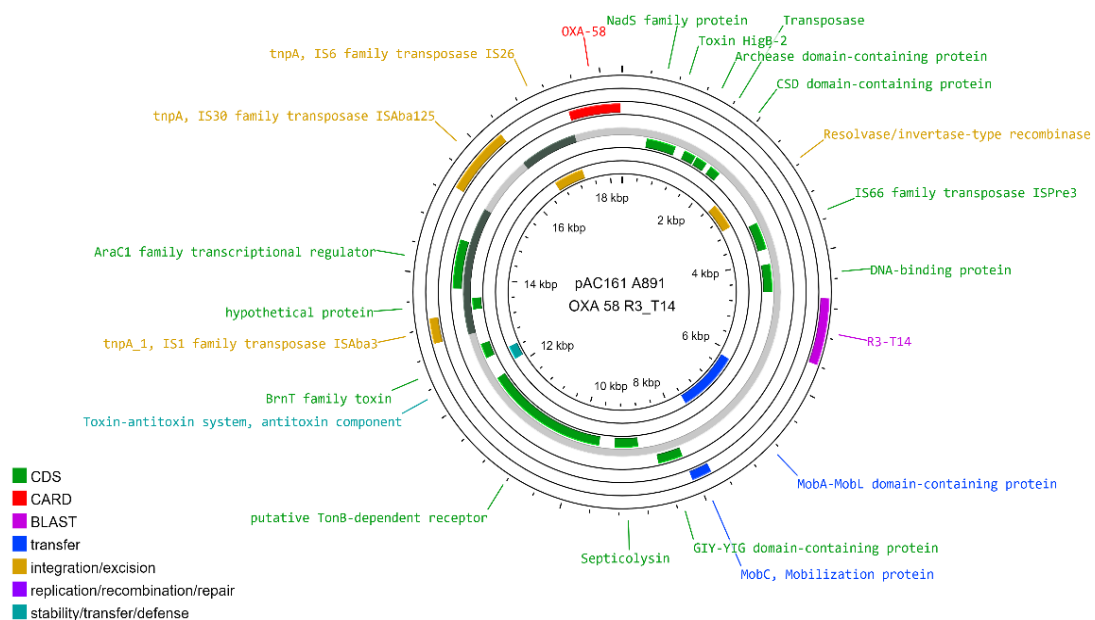
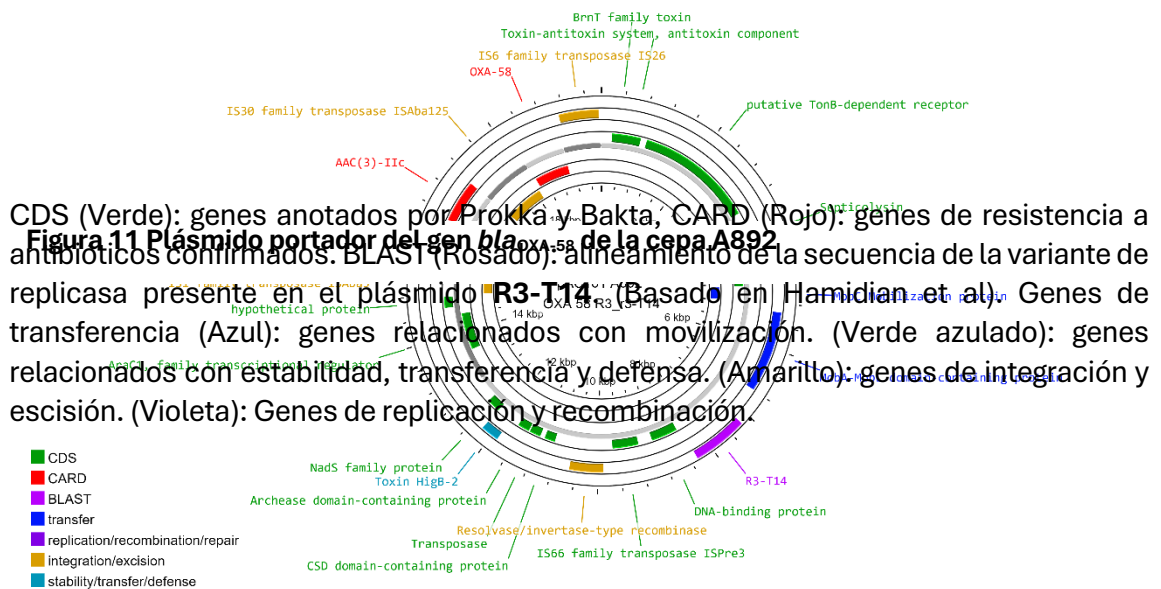


Figura 10: plásmido portador del gen *bla*_{OXA-58} de la cepa A891

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **R3-T14**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación



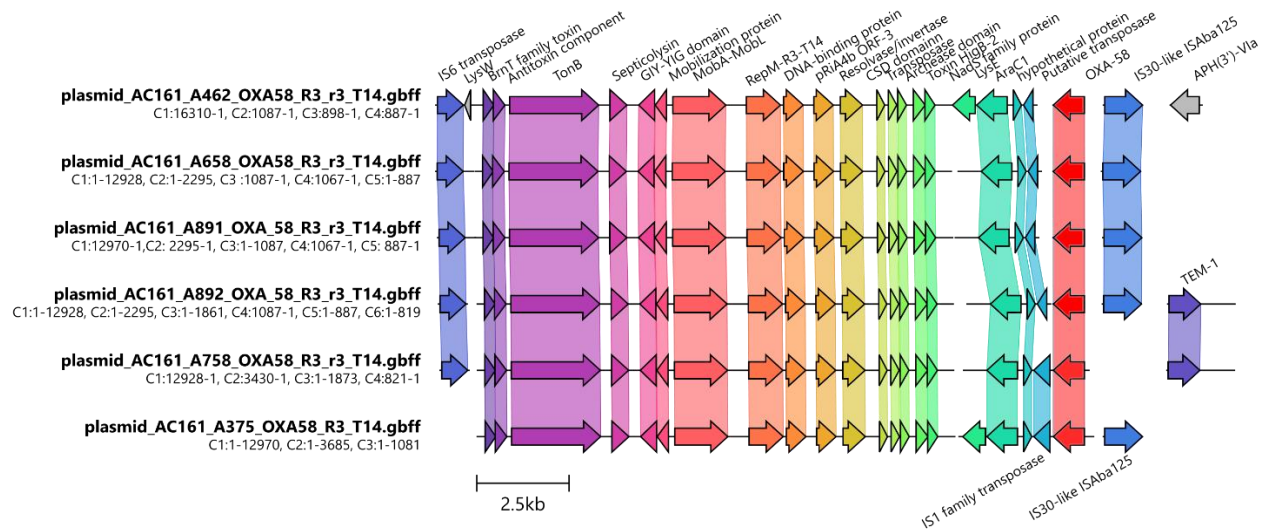


Figura 12: Comparación de plásmidos portadores de OXA-58 A cada gen se le asignó un color diferente solo para facilitar la visualización, las barras de color verticales indican identidad sobre un 80%. La línea negra horizontal indica la secuencia de ADN de un contig, la cual cada. La figura fue realizada mediante Clinker v0.023.

Los 6 plásmidos portadores de la carbapenemasa OXA-58 presentan una estructura similar, pudiendo encontrar en cada uno de ellos sistemas toxina-antitoxina como BrnT/BrnA, y HigB, además de presentar el receptor TonB relacionado con la virulencia de *A. baumannii*, y septicolisina una toxina relacionada con la formación de poros (Abdollahi et al., 2018). Por otro lado, todos estos plásmidos presentan variantes de Mob_Q, los cuales corresponden a genes relacionados con la capacidad de transferencia del plásmido (Mindlin et al., 2020). En cuanto a genes de resistencia, dos de los plásmidos son portadores de TEM-1 y un único plásmido es portador de Aph(3)6a como se puede apreciar en la **Figura 12**. El gen *bla*_{OXA-23} se detectó en los extremos de los contigs analizados, no fue posible realizar una caracterización completa del entorno genético asociado a este gen.

Plásmidos portadores de OXA-23 y replicasa RP-T1

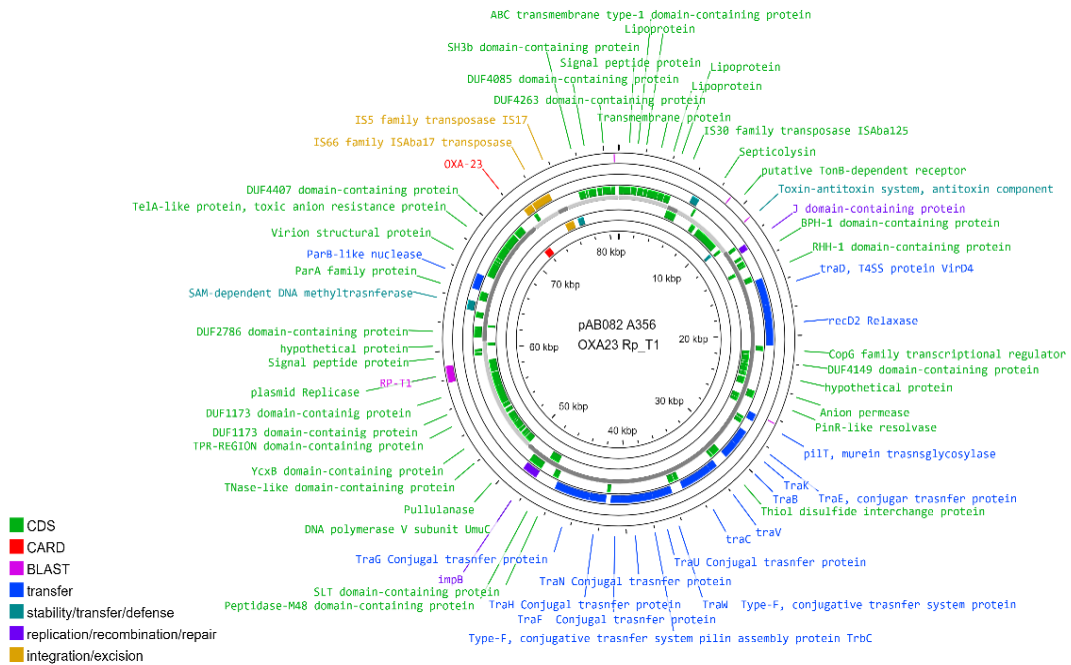


Figura 13: Plásmido portador del gen *bla*_{OXA-23} de la cepa A356

(Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **RP-T1**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación.

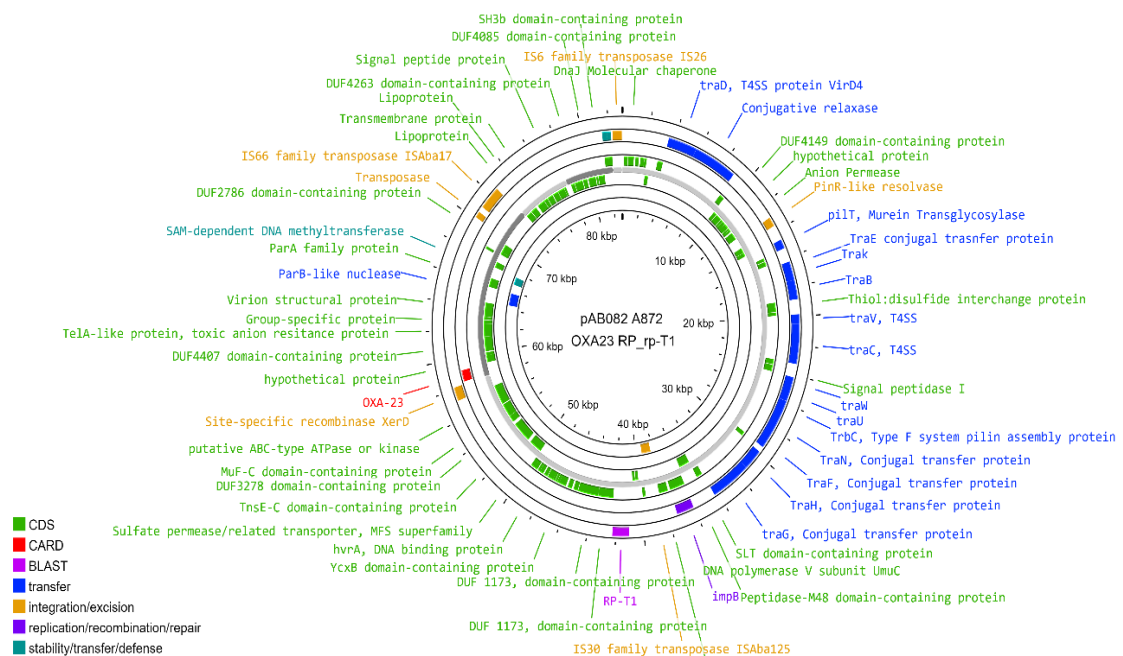


Figura 14: Plásmido portador del gen *bla*_{OXA-23} de la cepa A872.

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **RP-T1**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación.

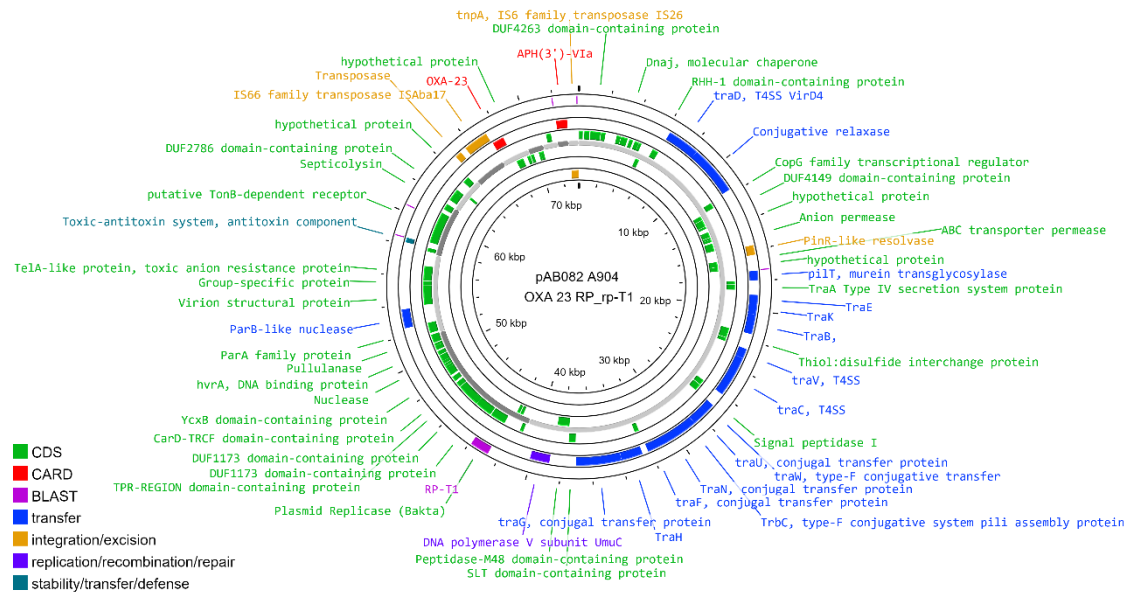


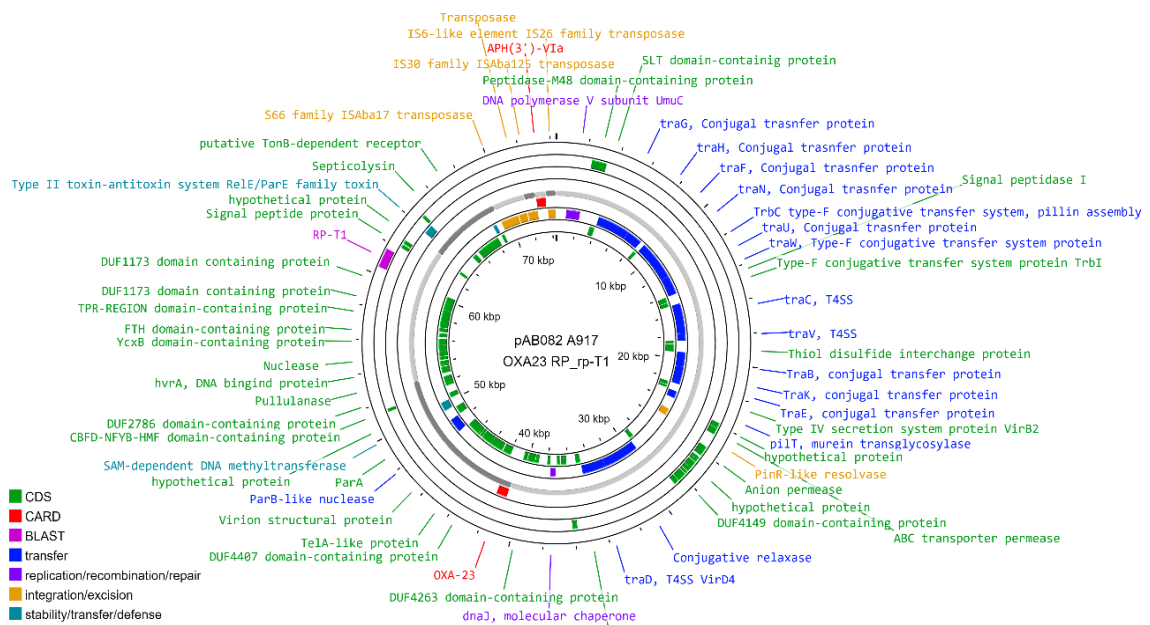
Figura 16: Plásmido portador del gen *bla*_{OXA-23} de la cepa A904

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **RP-T1**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación.



Figura 17: Plásmido portador del gen *bla*_{OXA-23} de la cepa A914

CDS (Verde): genes anotados por Prokka y Bakta, CARD (Rojo): genes de resistencia a antibióticos confirmados. BLAST (Rosado): alineamiento de la secuencia de la variante de replicasa presente en el plásmido **RP-T1**. (Basado en Hamidian et al). Genes de transferencia (Azul): genes relacionados con movilización. (Verde azulado): genes relacionados con estabilidad, transferencia y defensa. (Amarillo): genes de integración y escisión. (Violeta): Genes de replicación y recombinación.



Los plásmidos portadores del gen *bla*_{OXA-23}, a diferencia de los plásmidos portadores de *bla*_{OXA-58}, presentan un tamaño mayor, esto debido a la presencia de un gran conjunto de genes *tra* relacionados con el proceso de conjugación los cuales en todos los plásmidos se agrupan en el contig de mayor tamaño, tal como se puede apreciar en la **Figura 19A**. Dicho contig además presenta otros genes relacionados con la conjugación como genes de relaxasas y resolvasas. Por otro lado, como se puede apreciar en la **Figura 19B**, el gen de OXA-23 se encuentra en un extremo de un contig, acompañado del gen que codifica para el transportador EamA. En dicho contig también podemos encontrar genes como ParA/ParB que corresponden a sistemas de segregación o módulos de partición, y un gen de resistencia a telurito (TelA). En contigs más pequeños se puede apreciar la presencia de transposasas relacionadas con secuencias de inserción, tales como IS66, y al igual que en los plásmidos portadores de OXA-58, se puede apreciar la presencia de TonB y septicolisina además de componentes de sistemas toxina-antitoxina como Brn. En este caso, 4 de los plásmidos presentan otro gen de resistencia, *aph6a*, el cual está aislado en único contig pequeño, posiblemente flanqueado por IS, las cuales generalmente también están aisladas en un único contig como en este caso ocurre con IS6 e IS30.

Selección de cepas mutantes de *A. baumannii* resistente a rifampicina.

El proceso de selección de cepas de *A. baumannii* resistentes a rifampicina tuvo una duración 4 semanas, en las cuales se realizaron diversos cultivos de las 4 cepas a evaluar (ATCC19606, UCO565, A93-03, A90-41). Los resultados se presentan en la **Tabla 6**, en la cual se muestran los resultados de la determinación de la CMI para rifampicina de las cepas susceptibles a carbapenémicos que podrían ser utilizadas como receptoras. En este caso se realizaron 5 subcultivos sucesivos donde la cepa UCO-565 aumentó su CMI

de 2 µg/mL a ≥512 µg/mL en el subcultivo número 5. Este procedimiento se hizo por duplicado, coincidiendo los resultados al subcultivo 5, en donde esta cepa fue la única de las 4 que después de diversos ensayos aumentó considerablemente su CMI a rifampicina, por lo que UCO-565 resistente a rifampicina (UCO565M) fue la cepa receptora utilizada en los ensayos de conjugación. Adicionalmente, UCO565M presento una CMI a imipenem ≤0,5 µg/mL.

Tabla 7: Niveles de resistencia a rifampicina de las cepas de *Acinetobacter baumannii* receptoras utilizadas en este trabajo.

Cepas Receptoras	CMI a Rif (µg/mL)	S1 (µg/mL)	S2 (µg/mL)	S3 (µg/mL)	S4 (µg/mL)	S5 (µg/mL)	CMI final (µg/mL)
UCO 565	2	4	2	4	16	≥512	≥512
ATCC19606	2	≤0,5	1	2	4	2	2
A93-03	2	4	4	4	4	4	4
A90-41	2	4	4	4	4	4	4

Selección de cepas dadoras

Tabla 8: CMI a rifampicina de las cepas de *A. baumannii* dadoras productoras de OXAad.

Cepa	CMI a rifampicina (µg/mL)
A375	32
A462	≤0,5
A891	32
A892	64
A903	4

CMI: concentración mínima inhibitoria.

Ensayo de conjugación.

Con las cepas dadoras ya seleccionadas (A462 y A903) y la cepa mutante UCO565M como cepa receptora, se procedió a realizar el ensayo de conjugación en medio líquido detallado en la metodología. De este protocolo se realizaron múltiples ensayos con los pares conjugantes **A462/UCO565M** y **A903/UCO565M**. En este ensayo se obtuvo como resultado la selección de múltiples colonias en las placas de selección, específicamente 14 colonias las cuales se sembraron en placas de agar LB sin antibiótico para posteriormente hacer extracción de ADN y la confirmación de la presencia de genes de carbapenemasas, así como también la relación genética mediante ERIC-PCR. Al respecto, se puede apreciar que la colonia A3-3 es la única que presentó una banda

correspondiente al gen de *bla*_{OXA-23} (**Figura 20**), la cual mediante el resultado de Eric-PCR, se comprueba que no corresponde a una colonia de una posible cepa dadora resistente a rifampicina, si no que esta colonia portadora del gen de carbapenemasa corresponde según su perfil de bandas a una cepa receptora que ha adquirido dicho gen de resistencia como se evidencia en la **Figura 21**.

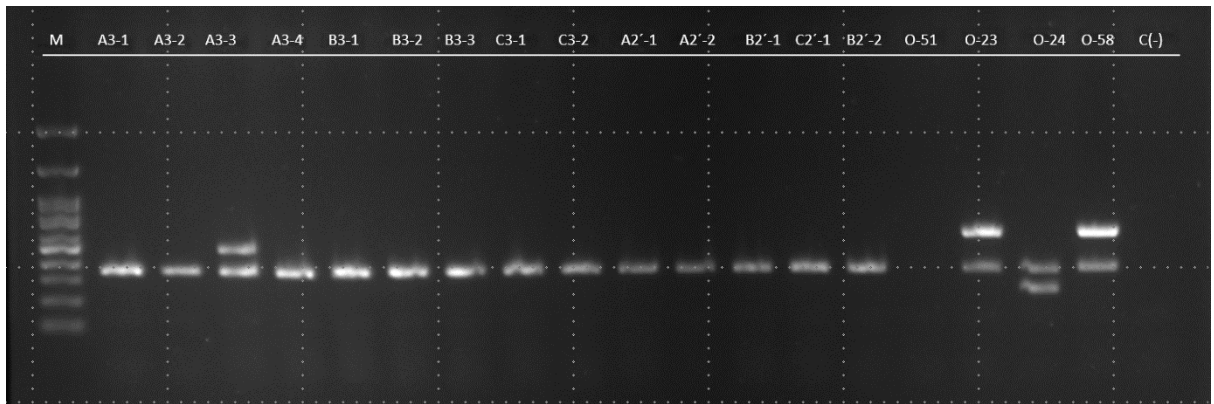


Figura 20: Gel de agarosa de PCR múltiple para detección de OXA Adquirida

En la figura se puede apreciar productos de PCR de las colonias seleccionadas en las placas de selección. **M:** marcador de peso 100pb . **O-51:** Control positivo para OXAAb. **O-23:** Control positivo OXA-23. **O-24:** Control positivo OXA-24/40. **O-58:** Control positivo OXA-58. **C (-):** Control negativo cepa ATCC 43300

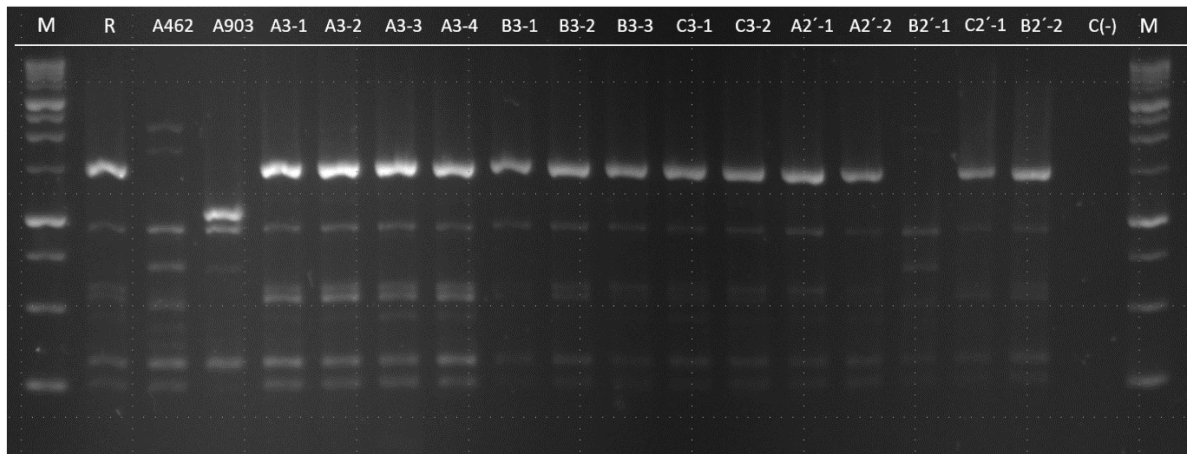


Figura 21: ERIC-PCR de cepas seleccionadas en placas con rifampicina e imipenem.

En la figura se puede apreciar el resultado de ERIC-PCR de las colonias seleccionadas en las placas de selección, a las cuales se les realizó extracción de ADN y posteriormente el protocolo de PCR, el resultado es un patrón de bandas característico de cada colonia. **M:** Marcador de peso 1kb. **R:** Cepa UCO565M receptora. **A462:** Cepa dadora portadora de OXA-58. **A903:** Cepa dadora portadora de OXA-23. **C(-):** Control negativo, muestra sin ADN bacteriano.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

Perfiles de resistencia y secuenciación

Los porcentajes de resistencia a carbapenémicos que presentan las cepas de estudio no es un reflejo de la realidad nacional, esto debido a que las cepas estudiadas corresponden a cepas de interés científico, por lo que presentan perfiles de resistencia a antibióticos elevados, por ejemplo, para el caso de antibióticos carbapenémicos un 80% aproximadamente de las cepas resultaron ser resistentes. Sin embargo, las instituciones nacionales encargadas de informar la realidad nacional, ISPCh y el MINSAL, presentaron en su último boletín de resistencia que las cepas *A. baumannii* aisladas de procesos de infecciones asociadas a atención en salud presentan aproximadamente un 46 % de resistencia a carbapenémicos durante el año 2020 (Instituto de Salud Pública Chile, 2022). Por otro lado, el grupo colaborativo de resistencia antimicrobiana de la Sociedad Chilena de Infectología (SOCHINF), el cual recopila datos de más de 50 centros de salud, informa que el porcentaje de susceptibilidad a carbapenémicos en cepas de *A. baumannii* es cercano al 30 % entre el 2019 y el 2021 (Instituto de Salud Pública Chile, 2022), siendo esta información la más cercana a la realidad, sin embargo, en nuestro grupo de cepas de estudio se incluyeron aislados provenientes de los últimos años, los cuales podrían ser reflejo de los cepas que están circulando en diferentes centros médicos del país.

Por otro lado, las 27 cepas analizadas en este estudio fueron consideradas para secuenciación debido a no ser susceptibles a carbapenémicos, específicamente 26 resistentes y 1 cepa con susceptibilidad intermedia a imipenem, de las cuales 15 presentaron en su genoma genes que codifican para carbapenemasas tipo oxacilinasas adquiridas (OXAad), de éstas, 8 cepas presentaron portación de *bla*_{OXA-23} (30%) y 7 aislados *bla*_{OXA-58} (26%). En el caso del mecanismo de resistencia a carbapenémicos de las 12 cepas que no presentaron OXAad portaban el arreglo genético ISAb₁/*bla*_{oxa-51 like} (44,4 %), en donde dichos resultados coinciden por lo descrito previamente por Opazo-Capurro *et al.* (Opazo-Capurro *et al.*, 2019). Sin embargo, nuestros resultados difieren con los del trabajo antes mencionado con relación a la distribución de mecanismos de resistencia en cepas correspondientes a los IC considerados de relevancia global, siendo el principal mecanismo de resistencia la presencia de carbapenemasas de la familia OXA-23 (Müller *et al.*, 2023). Además, las cepas de esta tesis presentan otros genes de resistencia de interés, como lo son genes de resistencia a aminoglucósidos (*ant*(3'')-IIa, *aph*(3')-VIa, *aac*(3)-IIe, *aph*(6)-Id, *aph*(3'')-Ib, *ant*(3'')-IIa), que corresponden a enzimas altamente descritas en cepas de *A. baumannii*, y generalmente relacionadas a elementos genéticos móviles como transposones y plásmidos (Naderi *et al.*, 2023; Rashvand *et al.*, 2021). En este sentido, en algunas de las cepas estudiadas en este trabajo se pesquisó la presencia de otros genes de resistencia, específicamente a sulfonamidas (gen *sul2*) (Hamidian *et al.*, 2016) el cual ha sido descrito en elementos genéticos móviles. Además, las cepas presentaron otros genes de resistencia a β -lactámicos, como *bla*_{ADC-234}, *bla*_{ADC-6} y *bla*_{ADC-105}, los cuales son considerados genes intrínsecos, ya que se encuentran generalmente codificados en el cromosoma. En el caso del gen *bla*_{TEM-1}, este normalmente se encuentra relacionado a elementos genéticos móviles, el cual fue pesquisado en 3 de las cepas de estudio. Es importante destacar que *esteg* ha sido relacionado con resistencia a antibióticos como sulbactam (Krizova *et al.*, 2013; Kyriakidis *et al.*, 2021).

Epidemiológicamente, as cepas secuenciadas correspondieron a 6 STs diferentes basados en el esquema del Instituto Pasteur disponible en la base de datos PubMLST, los cuales correspondieron a los ST109, ST162, ST1, ST15, ST318 y ST876, de los cuales, 7 cepas corresponden a ST pertenecientes al IC4 (2 del ST15 y 5 del ST318), 5 al ST162, una cepa correspondiente al ST1, una cepa correspondiente al ST109 y una cepa correspondiente al ST876, los cuales no corresponden a los clones internacionales (IC) de mayor relevancia (IC1 e IC2), con excepción de una única cepa perteneciente al ST1(IC1), lo cual no solo se ha descrito en Chile, sino que también en otros países de Latinoamérica, lo que representaría una diferencia evidente en la estructura poblacional en comparación con los aislados europeos y del resto del mundo, sugiriendo que el estudio de cepas de *A. baumannii* resistente a carbapenémicos requiere enfoques locales que busquen entender las características propias de las cepas circulantes en nuestro territorio (Hamidian & Nigro, 2019; Opazo-Capurro et al., 2019; Shelenkov et al., 2023).

La diversidad de IC en Latinoamérica es mucho mayor que en el resto de regiones del mundo según los estudios publicados por Müller et al, en donde en un análisis de 313 aislados de ABRC de 47 países demostraron que existe una mayor diversidad de IC en en nuestra región en comparación con el resto del mundo, evidenciando la predominancia del IC5 (54 %) frente al resto de clones y presentando similitud en cuanto a los porcentajes de diversidad entre el IC1(11.8 %),IC2 (10,5 %), IC4 (5,4 %), IC6 (4 %), IC7 (10,5 %) y sin IC(4 %) (Müller et al., 2023),. Por otro lado, se ha determinado en algunos estudios la predominancia del IC5 (ST79), altamente prevalente en Brasil, cuyas cepas se encuentran altamente relacionadas con el gen *bla_{oxa-72}*, la cual no fue encontrada en las cepas de este estudio. Adicionalmente, es relevante considerar la importancia de algunas cepas pertenecientes a STs que no son considerados dentro de los principales IC, como lo es el caso del ST162, al cual pertenecen varias cepas de este trabajo, en donde este grupo en particular fue inicialmente descrito en Corea del sur (Lee et al., 2012), y

posteriormente aislado en Brasil, siendo considerado como uno de los clones principales aislados en América del Sur junto con el ST15 y el ST79 (Brito et al., 2022; Chagas et al., 2014; de Azevedo et al., 2019). Estos resultados confirman la particular epidemiología de las cepas de Latinoamérica, en donde los principales IC de distribución global (IC1-3) no son los que predominan.

Respecto a lo mencionado anteriormente, es importante considerar que las cepas estudiadas corresponden a cepas aisladas en diferentes ciudades de Chile y en diferentes periodos de tiempo, tal como se puede apreciar en la Fig. 4, lo cual puede representar de mejor manera la epidemiología de ABRC en el país. Además, es importante considerar las condiciones socio-económicas, de desarrollo y geográficas de los países que contribuyen a la información disponible y con la que se contrastan los resultados obtenidos, debido a que las bases de datos globales presentan mayor cantidad de genomas provenientes de países con mayores recursos para la investigación, con lo cual se genera la sobreestimación de ciertos clones particulares, como por ejemplo, un gran porcentaje de los genomas disponibles en PubMLST (genomas de *A. baumannii* a la fecha 12.392) corresponden al IC2, en donde la mayoría de los genomas corresponden a aislados obtenidos en países como Estados Unidos, China, y Australia (Hamidian & Nigro, 2019; Jolley et al., 2018), por lo que la relevancia de estos IC está condicionada a la realidad de dichos países. Como se puede apreciar en este y otros trabajos, esta situación no representa la realidad en países latinoamericanos, lo que produce la subrepresentación de ciertos clones particulares.

Reconstrucción y caracterización de plásmidos.

La reconstrucción de los plásmidos en las cepas portadoras de las carbapenemasas *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58} realizada mediante MOB-Recon, evidenció que estas cepas presentan de a 4 a 9 tipos de plásmidos diferentes. Lamentablemente, debido a la técnica de secuenciación utilizada, es difícil estimar el número de copias de cada uno de estos plásmidos; sin embargo, esta metodología permitió reconstruir los plásmidos responsables de transportar los genes de carbapenemasas en 12 de las 15 cepas secuenciadas. Por otro lado, una de las grandes limitantes de la reconstrucción de plásmidos a partir de esta metodología es el hecho de que durante el proceso de secuenciación el genoma bacteriano sufre una fragmentación inicial y posterior ensamblaje, lo que no permite obtener la secuencia continua ni del cromosoma ni de los plásmidos presentes, sino que se obtienen fragmentos de diferentes tamaños (contigs), por lo que se dificulta predecir la configuración y el orden en los que estos se agrupa. Sin embargo, con el uso de herramientas bioinformáticas específicas, como Mob-Recon, es posible reconocer un alto porcentaje de los genes presentes de origen plasmídicos, siendo esta una limitante en todas las metodologías en las que se utilicen resultados de técnicas de secuenciación en los cuales el genoma bacteriano sufra un proceso de fragmentación (Arredondo-Alonso et al., 2017; Robertson & Nash, 2018).

Considerando la limitación anteriormente señalada, la caracterización de los plásmidos presentes en las cepas secuenciadas en este trabajo inicia con la clasificación de las variantes del gen *rep* presentes en los plásmidos, evidenciando una clara diferencia entre aquellos que portan el gen *bla*_{OXA-23} y los que portan el gen *bla*_{OXA-58}, correspondiendo al tipo RP-T1 y R3-T14, respectivamente. Por otro lado, los plásmidos RP-T1/OXA-23

fueron pesquisados en cepas pertenecientes principalmente al ST162 (5/6), y una cepa perteneciente al ST876, el cual ha sido escasamente reportado, en donde, según la información disponible en PubMLST, este ST se ha descrito en Japón, Jordania y Arabia Saudita. En el caso de las cepas pertenecientes al ST162, cuatro de ellas fueron aisladas en Concepción entre los años 2010-2022, mientras que una de ellas fue aislada en Temuco (A356) el año 2009, por lo que es posible que este plásmido (RP-T1/OXA-23) podría estar movilizando la carbapenemasa OXA-23 en este ST desde hace más de una década. Por otro lado, los plásmidos R3-T14/OXA-58 fueron pesquisados en cepas provenientes principalmente de Santiago y del ST 318,; sin embargo, una de estas cepas pertenece al ST109 (A375) la cual fue aislada el año 2008, mientras que el resto fueron aisladas entre el año 2010 y 2020, lo que al igual que en los plásmidos RP-T1, podría evidenciar la efectividad de estos plásmidos para mantener y diseminar genes de resistencia como *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-58}.

Plásmidos *bla*_{OXA-23}/RP-T1

Según la metodología de tipificación planteada por Bertini et al., estos plásmidos son clasificados como Aci6 (GR6) (Bertini et al., 2010), en donde estos poseen un módulo de transferencia dotado de una serie de genes necesarios para realizar el proceso de conjugación, por lo que se clasifican como conjugables o auto transmisibles. Específicamente, esta maquinaria consiste en la presencia de diversos genes que codifican para las proteínas Tra (TraA, TraD, TraE, TraK, TraB, TraV, TraC, TraW, TraU, TraN, TraF, TraH, TraG), en donde estos han sido pesquisados en otros plásmidos, como los plásmidos pertenecientes al linaje 1 descrito por Salgado et al. (Salgado-Camargo et al., 2020). Estos genes se encuentran relacionados con la formación del sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y con proteínas relacionadas con la conjugación, los cuales han

sido previamente reportados en plásmidos RP-T1 (GR6 Aci6) (Liu et al., 2014). Adicionalmente, estos plásmidos presentan algunos genes relacionados a módulos de partición, específicamente presenta el gen de la ATPasa ParA y ParB una proteína de unión a centromero, las cuales generalmente se organizan en un operón, estando relacionadas con plásmidos de alto peso molecular de bajo número de copias (Bignell & Thomas, 2001; Salgado-Camargo et al., 2020). Además, estos plásmidos presentan una citolisina denominada septicolisina, la que corresponde a una toxina formadoras de poros, (Rosado et al., 2008), la cual se encuentra cercana al gen del receptor TonB el cual se ha relacionado con la adquisición de hierro en cepas de *A. baumannii*. En este sentido, algunos trabajos en los que se comparan cepas portadoras y cepas mutantes con ausencia de este gen, se pudo evidenciar el rol que cumple este receptor dependiente de cobre en la virulencia de *A. baumannii*, relacionado con la disminución en la formación de biopelículas y capacidad de adherencia (Abdollahi et al., 2018; Dorsey et al., 2003). Esta combinación de genes ha sido pesquisada en una gran cantidad de plásmidos de *A. baumannii* portadoras de carbapenemasas tipo OXA (Acosta et al., 2011; Hujer et al., 2017). Adicionalmente, próximo a estos genes también se describen algunos sistemas toxina-antitoxina (TA). Específicamente, los sistemas del tipo II como RelE/ParE y BrnT/BrnA, sistemas relacionados con la respuesta al estrés y estabilización, los cuales han sido pesquisados en cepas relacionadas con brotes intrahospitalarios (Jurenaite et al., 2013; Makke et al., 2020).

Con respecto a los genes de resistencia, estos plásmidos además de ser portadores del *bla*_{OXA-23}, 4 de ellos portaban el gen *aph6a* (resistencia a amikacina), el cual se encuentra ampliamente descrito en *A. baumannii* generalmente relacionado al TnAphA6, en el cual este gen es flanqueado por dos copias de ISAb_a125 (Hamidian & Hall, 2014). Lamentablemente esta estructura no se pudo pesquisar en esta configuración

debido a que en los plásmidos portadores de *aph6a* este se encontraba como único gen en un contig, al igual que en el caso de las copias IS*Aba125*, lo que podría sugerir que esta estructura si está presente en los plásmidos y por las limitaciones de la técnica de secuenciación y de análisis de las secuencias esta no pudo ser reconstruida en su totalidad. Al igual que el contexto genético que flanquea al gen *bla*_{OXA-23} es difícil de predecir, ya que si bien no se encuentra como único gen en un contig, este se ubica en un extremo, posiblemente relacionado al igual que el caso anterior con la presencia de IS que flanquean al gen, dando origen a transposones altamente relacionados a este gen, como lo son el Tn2007 y Tn2008. Con el fin de confirmar esta información, posterior a la metodología empleada en este trabajo, se analizó el extremo del contig portador de la carbapenemasas en Mobile Element Finder disponible en la plataforma del Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>), la cual permitió confirmar que en este contig se pueden encontrar truncados tanto el Tn2007 como Tn2008 dependiendo del plásmido, siendo el primero más prevalente encontrándose en los contig portadores de OXA-23 en 4 de los 6 plásmidos, presentando sobre el 99% de identidad en la secuencia encontrada y cobertura del 49%. Por otro lado, en uno de estos plásmidos, específicamente el perteneciente a la cepa A872-ST876, no se encontró ningún transposón en las secuencias correspondientes al plásmido.

Por otro lado, según la clasificación Rep-type, Rp-T1 corresponde al tipo de plásmidos más abundantes, presentando una estructura genética predominante representada por el plásmido Pacicu2 (Numero de acceso a GenBank CP031382.1). Al respecto, y en concordancia con los autores del método de tipificación basada en Rep-type, un alto porcentaje de estos plásmidos son portadores de la carbapenemasas OXA-23 en las cepas estudiadas, y son clasificados como plásmidos pandémicos ya que se han pesquisado en diferentes STs e IC, específicamente en IC1, IC2, ST10, ST15, ST25, ST79, ST622 y ST162. Estos resultados son congruentes con publicaciones previas, en

donde diversas cepas del ST162 portan plásmidos Rp-T1 (RepAci6) portando el mismo tipo de carbapenemasa (OXA-23) relacionada a los transposones Tn2007 y Tn2008 (Brito et al., 2022; Lam & Hamidian, 2024).

Plásmidos *bla*_{OXA-58}/R3-T14

Los plásmidos pertenecientes a la superfamilia Rep3 son los más abundantes en el esquema de clasificación basado en la tipificación de la variante del gen *rep*. En este grupo, los tipos más abundantes son los T1-T4, los cuales según los esquemas planteados por Bertini *et al*, corresponderían a GR2 Aci1 o Aci2; sin embargo, los plásmidos resueltos en este trabajo pertenecieron a una variante de menor frecuencia, R3-T14, la cual inicialmente fue descrita en una cepa aislada en Australia, cuyos plásmidos fueron incluidos en la base de datos para la clasificación. Interesantemente, diversos estudios posteriores, los cuales incorporan cepas provenientes de otras regiones, incluyendo Latinoamérica, también presentan plásmidos de este grupo, tanto en plásmidos portadores de carbapenemasas como en plásmidos no portadores. Por otro lado, similar a los plásmidos RP-T1, los plásmidos R3-T14 presentan una distribución entre los diferentes IC, pero una mayor frecuencia en los pertenecientes al IC4 e IC5 (Lam et al., 2023; Lam & Hamidian, 2024).

Respecto a su capacidad de movilización, estos plásmidos a diferencia de los anteriormente mencionados, no poseen un amplio módulo de transferencia por lo que teóricamente se clasifican como movilizables, es decir, requieren de la presencia de otro plásmido colaborador que aporte con el arsenal genético que constituye el sistema de secreción necesario para su transferencia, los plásmidos R3-T14 reconstruidos en este trabajo presentan proteínas de movilización reconocidas por las bases de datos utilizadas

como MobA-MobL los cuales codifican para relaxasas, enzimas claves para el proceso de movilización, las cuales reconocen el origen de transferencia (*oriT*), catalizando en una primera instancia la escisión del *oriT* para preparar la hebra de ADN que se transferirá desde la célula donadora y finalmente en la célula receptora catalizará la ligadura final del ADN transferido y así reconstituyendo la estructura del plásmido (Smillie et al., 2010). Por otro lado, estos plásmidos son considerablemente más pequeños que los plásmidos RP-T1, con un tamaño aproximado de 18000pb, lo que los clasifica como plásmidos pequeños (menos de 20kpb), esto debido principalmente a la ausencia de los genes relacionados con la conjugación, sin embargo, estos presentan similitudes en cuanto a la presencia de genes como el arreglo genético TonB/Septicolisina anteriormente mencionado, así como también genes relacionados con virulencia y producción de biopelículas, además de presentar los sistemas toxina-antitoxina BrnT/BrnA y HigB, los que corresponden a los sistemas TA más comunes en plásmidos de *A. baumannii* cumpliendo funciones de ribonucleasas y reguladores transcripcionales en situaciones de estrés tales como procesos infecciosos, deficiencia de hierro y presencia de antibióticos (Armalyte et al., 2018).

Respecto a los genes de resistencia, algunos de estos plásmidos además de ser portadores de la carbapenemasa OXA-58 transportan otros genes de resistencia. Específicamente, dos plásmidos son portadores de *bla*_{TEM-1}, mientras que un plásmido presenta el gen *aph6A*. Desafortunadamente, estos genes, al igual que en los plásmidos RP-T1 reconstruidos en esta tesis, se ubican aislados en un único contig, lo cual dificulta el entendimiento de su entorno genético, sin embargo, al realizar un análisis posterior a la reconstrucción de los plásmidos mediante Mobile Element Finder encontramos que dichos contig además de portar el 100% del gen *bla*_{TEM-1} también presenta un 93% de cobertura del gen *aac(3)-IIa*, esto debido a, como se aprecia en la Figura 12, este contig presentaba una región de la secuencia que no codificaba a ningún gen, esto posiblemente

debido a los parámetros empleados en la anotación, pero los cuales fueron modificados mediante el uso de MEF. Por otro lado, fue posible detectar la presencia de IS6 (IS26) junto con *bla*_{TEM-1} y *aac2a*, lo que podría significar que estos plásmidos sean portadores del transposón Tn6925, el cual corresponde a estos dos genes flanqueados por IS26 descrito anteriormente en plásmidos de *A. baumannii* (Brito et al., 2022). Por otro lado, dicho transposón también ha sido descrito en cepas portadoras de OXA-58, específicamente el plásmido pAb45063_a (Numero de acceso Genbak MK323042.1) el cual presenta un tamaño similar a los plásmidos reconstruidos en este trabajo, portando un arreglo genético IS*Aba125-araC1-lysE*, que codifican para un regulador transcripcional (AraC) y para una proteína de treonina (*ysE*), los cuales son genes que fue posible encontrar en la secuencia de los reconstruidos como se puede apreciar en la Figura 12 (Evans et al., 2010; Matos et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, una de las principales limitantes de este trabajo es la reconstrucción de plásmidos a partir de secuencias fragmentadas obtenidas mediante la plataforma Illumina, sin embargo, en estudios recientemente publicados, diversos plásmidos de este tipo ya han sido pesquisados en cepas de *A. baumannii* aislados en Chile, lo cual corresponde a información que se publicó durante el desarrollo de esta tesis, ayudando a confirmar los resultados obtenidos del proceso de reconstrucción de los plásmidos. Específicamente, es importante resaltar el trabajo publicado por Brito et al (et al., 2022), en el cual analizaron 34 cepas resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos empleando técnicas de secuenciación de última generación, como la tecnología de secuenciación de *long-read* de Oxford Nanopore Technologies (ONT), la cual permitió la reconstrucción de las secuencias de los plásmidos de estas cepas. Es así que es interesante analizar la secuencia de algunas cepas que comparten características en cuanto a tamaño y portación de carbapenemasas con los plásmidos reconstruidos en este trabajo. Por un lado, los

autores describen dos cepas (UC24371 y UC25604) pertenecientes al ST162 y portadoras de un plásmido RepAci6 portador de OXA-23 denominados p1UC256054 (88371pb) y p1UC24371 (105056pb) (números de acceso en GenBank CP076802 y CP076805 respectivamente), y una cepa (UC21460-T318), número de acceso Genbank CP076814, portadora de un plásmido portador de OXA-58 denominado p2UC21460 (17649pb) (número de acceso a GenBank CP076816), en donde dichos plásmidos fueron comparados posteriormente con un representante de cada tipo de plásmido obtenido en esta tesis (Anexo 1), presentando amplias similitudes en sus estructuras. Sin embargo, es necesario considerar las limitaciones al aplicar dichas comparaciones, si bien las cepas presentan similitudes y pertenecen al mismo ST, es necesario considerar que los plásmidos son elementos genéticos móviles que pueden sufrir variaciones en sus secuencias mediados por diferentes mecanismos (García-Aljaro et al., 2017; Pfeifer & Rocha, 2024). Primeramente, al comparar el plásmido R3-T14 portador OXA-58 reconstruido a partir de secuenciación en plataforma Illumina, presenta similitudes importantes con el plásmido descrito en las cepas del trabajo de Brito y colaboradores, secuenciadas y ensamblada de manera híbrida (short reads y long reads), permitiéndonos por un lado, respaldar que el proceso de reconstrucción de plásmidos de este tipo es posible a partir de secuencias del genoma completo fragmentado, y además, permite esclarecer de mejor manera el contexto genético en el que podría estar inmerso el gen *bla_{OXA-58}* en las cepas pertenecientes al ST 318 que podríamos aislar de procesos infecciosos en nuestro país. Por otro lado, la comparación de plásmidos Rp-T1 se realizó con dos plásmidos reportados en el trabajo anteriormente mencionado, en donde en este caso se evidenciaron mayores diferencias entre los plásmidos, principalmente en el contenido de proteínas hipotéticas, las cuales están ausentes en los plásmidos reconstruidos en esta tesis. En relación al contexto genético de *bla_{OXA-23}*, como ya se mencionó anteriormente, este podría estar flanqueado por IS como parte de Tn2007 o Tn2008, las cuales fueron identificadas en el trabajo de Brito *et al.* Por otro lado, el arsenal

de genes relacionados con el proceso de conjugación está igualmente presentes en los plásmidos del trabajo de Brito *et al*, respaldando el hecho de que la diseminación de carbapenemasas como OXA-23 está siendo diseminada por procesos de conjugación liderados por plásmidos conjugativos en las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos en Chile.

Conjugación

Finalmente, bajo las condiciones propuestas en esta tesis para el ensayo de conjugación, se pudo confirmar la capacidad de movilización de los plásmidos resueltos en base a las secuencias de las cepas de trabajo. En esta tesis se optó por trabajar con dos cepas, cada una portadora de un tipo de plásmidos, específicamente la cepa A903 portadora de un plásmido RP-T1/OXA23 y por otro lado la cepa A462 portadora de un plásmido R3-T14/OXA58, esto debido a los resultados de CMI a rifampicina que presentaban el resto de cepas de estudio, con la intención de reducir la posibilidad de seleccionar cepas dadoras mutantes resistentes a rifampicina, la cual es elevada en comparación a otras bacterias (Pachón-Ibáñez *et al.*, 2006). Sin embargo, bajo condiciones empleadas y como se presenta en los resultados, en el caso del par conjugante A462 x UCO565M, no se obtuvieron colonias en las placas de selección, considerando la información *in silico* de los plásmidos reconstruidos y sus capacidades de movilización, el resultado es el esperado para un plásmido clasificado como movilizable y que carece de la maquinaria necesaria para realizar el proceso de conjugación, por lo que requieren la participación de un plásmido que si porte dichos genes (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011). Al respecto, se ha documentado la transferencia de un plásmido movilizable mediante un plásmido conjugativo (Blackwell & Hall, 2019). Además, es importante considerar la posibilidad de movilización de este tipo de

elementos genéticos mediante mecanismos considerados no canónicos, como lo es la transferencia mediada por vesículas de membrana que podrían transportar pequeños plásmidos (Fulsundar et al., 2019), los que podrían facilitar la movilización de plásmidos de este tipo. Por otro lado, la conjugación del par conjugante A903 x UCO565M generó colonias transconjugantes en las placas de selección, las cuales fueron confirmadas mediante PCR, tal como se puede apreciar en la Figura 21 y 22, en la cual la colonia denominada como A3-3 presenta el gen de *bla*_{OXA-23}. Adicionalmente, mediante ERIC-PCR se confirmó que esta es isogénica con la cepa receptoras UCO565M, ratificando la conjugación del plásmido en las condiciones propuestas en este trabajo. Sin embargo, en este proceso se tuvo que ajustar las concentraciones de antibióticos en las placas de selección para facilitar la selección, ya que en una primera instancia se utilizó concentraciones mayores, en las cuales no se obtuvieron colonias. Es importante destacar que en las placas también crecieron colonias las cuales no presentaban el gen de *bla*_{OXA-23}, por lo que estas condiciones si bien permitieron obtener una cepa transconjugante es necesario optimizar dicha metodología. Interesantemente, plásmidos similares al reconstruido en este trabajo han logrado ser conjugados exitosamente reafirmando su capacidad de movilización (Hamidian et al., 2014).

El estudio de la capacidad de las bacterias para adaptarse a diferentes ambientes y condiciones es una arista más en el estudio de la resistencia antimicrobiana, en donde esta habilidad es impulsada en gran medida por fenómenos de transferencia horizontal de genes, específicamente mediante plásmidos, los cuales en el caso de *A. baumannii* juegan un rol central en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos de gran relevancia clínica, como lo son los carbapenémicos. Sin embargo, existe una tendencia en centrarse en la presencia de estos genes sin considerar el resto de los genes que configuran el elemento genético móvil como tal, los cuales pueden estar altamente

relacionados con el éxito que pueda tener dicho plásmido en la diseminación y el mantenimiento de estos genes, como lo son en este caso las características de sistemas toxina/antitoxina. Una limitación de este trabajo es que no se pudo profundizar en el impacto de estos plásmidos en el *fitness* de las cepas estudiadas, sin embargo, considerando los periodos de tiempo en los cuales se aislaron dichas bacterias, podrían considerarse como plásmidos exitosos y los cuales no deben tener un alto costo en cuanto al *fitness* bacteriano, para lo cual habría que considerar ciertos aspectos como sistemas de partición (Salje, 2010), frecuencia de conjugación, mutaciones en el plásmidos que disminuyan su impacto en el fitness (Lopatkin et al., 2017) , es decir, evolución compensatoria (Harrison et al., 2015), así como también la producción de biopelículas, el cual corresponde a un factor que favorece la persistencia de plásmidos (Stalder et al., 2020), siendo estas características importantes factores a estudiar para un mejor entendimiento del impacto de los plásmidos en la evolución y adaptación de bacterias de importancia clínica como *A. baumannii*.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIÓN

Finalmente, considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que la hipótesis planteada es **parcialmente aceptada**, ya que en el caso de la diseminación de la carbapenemasa OXA-58 en cepas de *A. baumannii aisladas* en Chile se debe a plásmidos movilizables o no conjugativos, mientras que la diseminación de la carbapenemasa OXA-23 es mediada por plásmidos conjugativos o auto transmisibles. Ambos casos corresponden estructuras genéticas móviles que permiten la diseminación y el mantenimiento de estos importantes genes de resistencia a carbapenémicos y los cuales han sido pesquisados en cepas pertenecientes a diferentes ST.

Los plásmidos pueden actuar como catalizadores de la evolución, sufriendo procesos de variabilidad y de selección propios de su estilo de vida, a lo que se suman los procesos evolutivos propios de la bacteria que los porta generando una compleja e interesante relación de coevolución, en el contexto de la resistencia antimicrobiana es claro que juegan un rol clave en la diseminación y mantención de genes de resistencia, pero desde un punto de vista personal, quizás herrado, representan de alguna forma la materialización de la experiencia, un elemento físico, construido por la variabilidad y elegido por la selección natural, el cual permite que las vivencias de individuos o comunidades del pasado, incluso contemporáneos que se transmiten para superar las adversidades de la actualidad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo esta principalmente dedicado a mi familia, la cual me dio la oportunidad de estudiar y dedicarme a lo que me gusta, apoyarme sin importar el tiempo ni las vueltas que tomó este camino, también quiero agradecer a mis profesores y profesoras durante estos años, tanto en el pregrado como el posgrado, fueron quienes me formaron y me dieron las herramientas para afrontar los desafíos que presenta el futuro, especialmente a mi profesor tutor en este trabajo, Dr. Andres Opazo, primero por la paciencia y segundo por permitirme de alguna forma seguir una línea de investigación entorno a *Acinetobacter baumannii* y la resistencia a los antibióticos, una investigación con historia en la cual el LIAA ha hecho grandes aportes, desde el estudio del rol de integrones, la contribución de las secuencias de inserción y ahora los plásmidos entorno a esta bacteria. además agradecer al Dr. Gerardo González y a la Dra. Helia Bello por abrirme las puertas del laboratorio y siempre tenerme confianza y palabras de aliento en este camino, finalmente a la comunidad de LIAA, que siempre ha brindado un entorno de trabajo fraterno, especialmente a Paulina González por confiar y ayudarme dentro y fuera del laboratorio.

Finalmente, a mi compañera, Natalia, la que me acompaño y animó durante todo este tiempo, y en la cual encontré las palabras de razón que me hacían falta en mis momentos de dudas.

Bibliografía

- Abdollahi, S., Rasooli, I., & Mousavi Gargari, S. L. (2018). The role of TonB-dependent copper receptor in virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infection, Genetics and Evolution*, 60, 181–190. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2018.03.001>
- Abouelfetouh, A., Mattock, J., Turner, D., Li, E., Evans, B. A., & Evans, B. (2022). Diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and bacteriophage-mediated spread of the Oxa23 carbapenemase. *Microbial Genomics*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000752>
- Abubakar, S., Misbah, S., Hassan, H., Yusof, Y., Hanifah, Y. A., & Abubakar, S. (2005). Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Medical Journal*.
- Acosta, J., Merino, M., Viedma, E., Poza, M., Sanz, F., Otero, J. R., Chaves, F., & Bou, G. (2011). Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 Carbapenemase, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 17(6), 1064–1067. <https://doi.org/10.3201/EID1706.091866>
- Adams, M. D., Chan, E. R., Molyneaux, N. D., & Bonomo, R. A. (2010). Genomewide Analysis of Divergence of Antibiotic Resistance Determinants in Closely Related Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 54(9), 3569–3577. <https://doi.org/10.1128/AAC.00057-10>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., ... McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC920>
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 251–259). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A Degenerate Primer MOB Typing (DPMT) Method to Classify Gamma-Proteobacterial Plasmids in Clinical and Environmental Settings. *PLOS ONE*, 7(7), e40438. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040438>

- Ambler, R. (1980). The structure of β -lactamases. *Trans. R. Soc. Lond. B*, 289, 321–331. <http://rstb.royalsocietypublishing.org/>
- Ambrose, S. J., Evans, B. A., & Hall, R. M. (2022). Origin of the oxa235 carbapenem resistance gene found in transposon Tn6252. *J Antimicrob Chemother*, 77, 1197–1199. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac013>
- Araya, I., Roach-Poblete, F., Tapia, T., Rodas, P. I., Villamil, A., Agüero, R., Iglesias, R., Gárate, D., Duery, O., Flores, R., Ibáñez, D., Fernández, J., Araya, P., Orsini, M., & Hormazábal, J. C. (2021). Phenotypic and molecular characterization of OXA-48 like producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 39. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182022000500551>
- Armalyte, J., Jurenas, D., Krasauskas, R., Čepauskas, A., & Sužiedeliene, E. (2018). The higBA toxin-antitoxin module from the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii* - Regulation, activity, and evolution. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 361994. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00732/BIBTEX>
- Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J., van Schaik, W., & Schürch, A. C. (2017). On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial Genomics*, 3(10). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000128>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Aubert, D., Naas, T., Héritier, C., Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of β -lactam resistance genes. *Journal of Bacteriology*, 188(18), 6506–6514. <https://doi.org/10.1128/JB.00375-06>
- Aurilio, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L. G., Coppolino, F., Barbarisi, A., Passavanti, M. B., & Pace, M. C. (2022). Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421>
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58(11), 905–917. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201800204>
- Bae, D. W., Jung, Y. E., An, Y. J., Na, J. H., & Cha, S. S. (2019). Structural insights into catalytic relevances of substrate poses in ACC-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01411-19>

- Balalovski, P., & Grainge, I. (2020). Mobilization of pdf modules in *Acinetobacter*: A novel mechanism for antibiotic resistance gene shuffling? *Molecular Microbiology*, 114(5), 699–709. <https://doi.org/10.1111/MMI.14563>
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P. D., Villa, L., Nordmann, P., & Carattoli, A. (2010). Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4168–4177. <https://doi.org/10.1128/AAC.00542-10/ASSET/79869FA6-C0AE-40A5-BCA6-6428D072885E/ASSETS/GRAPHIC/ZAC9991093100001.JPEG>
- Bignell, C., & Thomas, C. M. (2001). The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *Journal of Biotechnology*, 91(1), 1–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00293-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00293-0)
- Blackwell, G. A., & Hall, R. M. (2019). Mobilisation of a small *Acinetobacter* plasmid carrying an oriT transfer origin by conjugative RepAci6 plasmids. *Plasmid*, 103, 36–44. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2019.04.002>
- Bonnin, R. A., Girlich, D., Jousset, A. B., Gauthier, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Haenni, M., Madec, J. Y., Couvé-Deacon, E., Barraud, O., Fortineau, N., Glaser, P., Glupczynski, Y., Dortet, L., & Naas, T. (2020). A single *Proteus mirabilis* lineage from human and animal sources: a hidden reservoir of OXA-23 or OXA-58 carbapenemases in Enterobacterales. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66161-z>
- Boral, J., Genç, Z., Pınarlık, F., Ekinci, G., Kuskucu, M. A., İrkören, P., Kapmaz, M., Tekin, S., Çakar, N., Şentürk, E., Yurdakul, F., Dikenelli, B., Can, F., & Onder Ergonul, &. (123 C.E.). The association between *Acinetobacter baumannii* infections and the COVID-19 pandemic in an intensive care unit. *Scientific Reports*, 12, 20808. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25493-8>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA345>
- Bou, G., Oliver, A., & Martínez-Beltrán, J. (2000). OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1556–1561. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000>

- Bou, G., Oliver, A., & Martínez-Beltrán, J. (2006). Erratum: OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain (Antimicrobial Agents and Chemotherapy [2000] 44, 6 [1556-1561]). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), 2280. <https://doi.org/10.1128/AAC.00514-06>
- Bragagnolo, N., Rodriguez, C., Samari-Kermani, N., Fours, A., Korouzhdehi, M., Lysenko, R., & Audette, G. F. (2020). Protein Dynamics in F-like Bacterial Conjugation. *Biomedicines* 2020, Vol. 8, Page 362, 8(9), 362. <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES8090362>
- Brito, B. P., Koong, J., Wozniak, A., Opazo-Capurro, A., To, J., Garcia, P., & Hamidian, M. (2022). Genomic Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Recovered from Chilean Hospitals Reveals Lineages Specific to South America and Multiple Routes for Acquisition of Antibiotic Resistance Genes. *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/DOL:https://doi.org/10.1128/spectrum.02463-22>
- Brovedan, M. A., Cameranesi, M. M., Limansky, A. S., Morán-Barrio, J., Marchiaro, P., & Repizo, G. D. (2020). What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus? *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2020 36:8, 36(8), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11274-020-02890-7>
- Brown, C. L., Mullet, J., Hindi, F., Stoll, J. E., Gupta, S., Choi, M., Keenum, I., Vikesland, P., Pruden, A., & Zhang, L. (2022). mobileOG-db: a Manually Curated Database of Protein Families Mediating the Life Cycle of Bacterial Mobile Genetic Elements. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.00991-22>
- Bush, K. (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), 259–263. <https://doi.org/DOL:https://doi.org/10.1128/aac.33.3.259>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211–1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2005.03.018>
- Carfi, A., Pares, S., Duée, E., Galleni, M., Duez, C., Frère, J. M., & Dideberg, O. (1995). The 3-D structure of a zinc metallo- β -lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO Journal*, 14(20), 4914–4921. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1995.TB00174.X>
- Carrasco-Anabalón, S., Vera-Leiva, A., Quezada-Aguiluz, M., Morales-Rivera, M. F., Lima, C. A., Fernández, J., Ulloa, S., Domínguez, M., González-Rocha, G., & Bello-Toledo, H. (2018). Genetic platforms of blaCTX-Min carbapenemase-producing strains of *K. pneumoniae* isolated in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 315427. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00324/BIBTEX>
- Carrër, A., Poirel, L., Eraksoy, H., Cagatay, A. A., Badur, S., & Nordmann, P. (2008). Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(8), 2950–2954. <https://doi.org/10.1128/AAC.01672-07>
- Castanheira, M., Mendes, R. E., & Gales, A. C. (2023). Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex Clinical Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad109>
- Center for Disease Control and Prevention. (2022, October 22). *Antibiotic Resistance. How Resistance Happens*. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Outpatient Antibiotic Prescriptions — United States, 2021. *CDC*. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html>
- Centers for Disease Control, U. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Cerezales, M., Xanthopoulou, K., Wille, J., Krut, O., Seifert, H., Gallego, L., & Higgins, P. G. (2020). Mobile Genetic Elements Harboring Antibiotic Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii* Isolates From Bolivia. *Frontiers in Microbiology*, 11, 527172. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00919/BIBTEX>
- Cerqueira, G. M., & Peleg, A. Y. (2011). Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life*, 63(12), 1055–1060. <https://doi.org/10.1002/IUB.533>

- Chagas, T. P. G., Carvalho, K. R., de Oliveira Santos, I. C., Carvalho-Assef, A. P. D. A., & Asensi, M. D. (2014). Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23–producing clones (CC15 and CC79). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(4), 468–472. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2014.03.006>
- Chagas, T. P. G., Tavares e Oliveira, T. R., D’Alincourt Carvalho-Assef, A. P., Albano, R. M., & Asensi, M. D. (2017). Carbapenem-resistant *Acinetobacter pittii* strain harboring blaOXA-72 from Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(1), 93–94. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2017.01.022>
- Chan, A. P., Choi, Y., Clarke, T. H., Brinkac, L. M., White, R. C., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., Adams, M. D., & Fouts, D. E. (2020). AbGRI4, a novel antibiotic resistance island in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(10), 2760–2768. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA266>
- Chapartegui-González, I., Lá zaro-Díez, M., Bravo, Z., Navas, J., Icardo, J. M., & Ramos-Vivas, J. (2018). *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PloS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961>
- Chen, F. J., Huang, W. C., Liao, Y. C., Wang, H. Y., Lai, J. F., Kuo, S. C., Lauderdale, T. L., & Sytwu, H. K. (2019). Molecular epidemiology of emerging carbapenem resistance in *acinetobacter nosocomialis* and *acinetobacter pittii* in Taiwan, 2010 to 2014. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02007-18/FORMAT/EPUB>
- Chen, T. L., Siu, L. K., Wu, R. C. C., Shaio, M. F., Huang, L. Y., Fung, C. P., Lee, C. M., & Cho, W. L. (2007). Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(8), 801–806. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01744.x>
- Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S. K., & Lee, J. C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 7(8), 1127–1138. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2005.00538.X>
- CLSI. (2024). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In *CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute: Vol. 34th ed* (34th ed.). <https://clsi.org/terms-of-use/>.

- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. In *Medical sciences (Basel, Switzerland)* (Vol. 6, Issue 1). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>
- Cosgaya, C., Marí-Almirall, M., Ado, †, Assche, V., Fernandez-Orth, D., Mosqueda, N., Telli, M., Huys, G., Higgins, P. G., Seifert, H., Lievens, B., Roca, I., & Vila, J. (2016). *Acinetobacter* *dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 4105–4111. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001318>
- Cox, J. A., Vlieghe, E., Mendelson, M., Wertheim, H., Ndegwa, L., Villegas, M. V, Gould, I., & Hara, G. L. (2017). Antibiotic stewardship in low- and middle-income countries: the same but different? *Clinical Microbiology and Infection*, 23, 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.010>
- de Azevedo, F. K. S. F., Dutra, V., Nakazato, L., Mello, C. M., Pepato, M. A., de Sousa, A. T. H. I., Takahara, D. T., Hahn, R. C., & Souto, F. J. D. (2019). Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in central brazil: The role of st730 and st162 in clinical outcomes. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 31–40. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000853/CITE/REFWORKS>
- Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 831–838. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>
- Doi, Y. (2019). Clinical Infectious Diseases Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases* ®, 69(S7), 565–575. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>
- Domingues, S., Harms, K., Fricke, W. F., Johnsen, P. J., & Silva, D. (2012). Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrations and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLoS Pathog*, 8(8), 1002837. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002837>
- Domingues, S., Nielsen, K. M., & Da Silva, G. J. (2011). The blaIMP-5-carrying integron in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain is flanked by miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(11), 2667–2668. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR327>

- Donald, H. M., Scaife, W., Amyes, S. G. B., & Young, H. K. (2000). Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), 196–199. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.196-199.2000/FORMAT/EPUB>
- Dorsey, C. W., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H., & Actis, L. A. (2003). Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology*, 149(5), 1227–1238. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.26204-0/CITE/REFWORKS>
- Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., & Actis, L. A. (2006). Sequence and organization of pMAC, an *Acinetobacter baumannii* plasmid harboring genes involved in organic peroxide resistance. *Plasmid*, 56(2), 112–123. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2006.01.004>
- Dortet, L., Bonnin, R. A., Bernabeu, S., Escaut, L., Vittecoq, D., Girlich, D., Imanci, D., Fortineau, N., & Naas, T. (2016). First occurrence of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Serbia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 5724–5730. <https://doi.org/10.1128/AAC.01016-16>
- Duval, V., Swinnen, M., Lepage, S., Brans, A., Granier, B., Franssen, C., Frère, J. M., & Joris, B. (2003). The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of β -lactamase synthesis. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1553–1564. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03520.X>
- Elhosseiny, N. M., & Attia, A. S. (2018). *Acinetobacter*: An emerging pathogen with a versatile secretome review-article. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1038/S41426-018-0030-4>
- Elshamy, A. A., & Aboshanab, K. M. (2020). A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future Science OA*, 6(3). <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0098>
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
- Evans, B. A., Hamouda, A., Towner, K. J., & Amyes, S. G. B. (2010). Novel genetic context of multiple blaOXA-58 genes in *Acinetobacter* genospecies 3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1586–1588. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ180>

- Fitzpatrick, M. A., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2016). Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing *Acinetobacter* Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 593–612. <https://doi.org/10.1128/JCM.01818-15>
- Fonseca, É. L., Caldart, R. V., Freitas, F. S., Morgado, S. M., Rocha, L. T., Santos, R. C. Dos, Carolina, A., & Vicente, P. (2020). Emergence of extensively drug-resistant international clone IC-6 *Acinetobacter baumannii* carrying bla OXA-72 and bla CTX-M-115 in the Brazilian Amazon region. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.014>
- Fu, Y., Jiang, J., Zhou, H., Jiang, Y., Fu, Y., Yu, Y., & Zhou, J. (2014). Characterization of a Novel Plasmid Type and Various Genetic Contexts of blaOXA-58 in *Acinetobacter* spp. from Multiple Cities in China. *PLOS ONE*, 9(1), e84680. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0084680>
- Fulsundar, S., Domingues, S., & Nielsen, K. M. (2019). Vesicle-Mediated Gene Transfer in *Acinetobacter baumannii*. *Methods in Molecular Biology*, 1946, 87–94. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_9
- Galata, V., Fehlmann, T., Backes, C., & Keller, A. (2019). PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D195–D202. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1050>
- García-Aljaro, C., Ballesté, E., & Muniesa, M. (2017). Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 95–105. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.04.011>
- García-Betancur, J. C., Appel, T. M., Esparza, G., Gales, A. C., Levy-Hara, G., Cornistein, W., Vega, S., Nuñez, D., Cuellar, L., Bavestrello, L., Castañeda-Méndez, P. F., Villalobos-Vindas, J. M., & Villegas, M. V. (2021). Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 19, Issue 2, pp. 197–213). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
- Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A., & De la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 936–956. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00291.X>
- Geisinger, E., Isberg, R. R., & Weiss, D. (2015). Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLOS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004691>
- Gerner-Smidt, P. (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10), 2680–2685. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.10.2680-2685.1992>

- Gilchrist, C. L. M., & Chooi, Y. H. (2021). clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, 37(16), 2473–2475. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAB007>
- Girardello, R., Visconde, M., Cayô, R., Figueiredo, R. C. B. Q. de, Mori, M. A. da S., Lincopan, N., & Gales, A. C. (2017). Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2016.10.011>
- Gombac, F., Riccio, M. L., Rossolini, M. G., Lagatolla, C., Tonin, E., Monti-Bragadin, C., Lavenia, A., & Dolzani, L. (2002). Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian Hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3665–3668. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3665-3668.2002>
- Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C. Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD326>
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Epidemiology & Infection*, 27(2), 113–159. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>
- H. Rodríguez, C., Nastro, M., A. Flores, S., Rodríguez, M., Spinozzi, M., Bruni, G., L. López, A., David, V., S. Aiassa, M., A. Marqués, I., R. Navarro, O., Paniccia, L., & Famiglietti, A. (2019). Epidemiología molecular de aislados de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenems en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(3), 247–250. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2017.12.004>
- Halat, D. H., & Moubareck, C. A. (2020). The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
- Hall, R. J., Whelan, F. J., McInerney, J. O., Ou, Y., & Domingo-Sananes, M. R. (2020). Horizontal Gene Transfer as a Source of Conflict and Cooperation in Prokaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 536378. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01569/BIBTEX>
- Hall, R. M. (2013). Integrons. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 107–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00804-4>

- Hamidian, M., Ambrose, S. J., & Hall, R. M. (2016). A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the sul2 sulphonamide and strAB streptomycin resistance genes. *Plasmid*, 87–88, 43–50. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2016.09.001>
- Hamidian, M., & Hall, R. M. (2013). ISAba1 targets a specific position upstream of the intrinsic ampC gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 2682–2693. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt233>
- Hamidian, M., & Hall, R. M. (2014). pACICU2 is a conjugative plasmid of *Acinetobacter* carrying the aminoglycoside resistance transposon TnaphA6. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 1146–1148. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKT488>
- Hamidian, M., Kenyon, J. J., Holt, K. E., Pickard, D., & Hall, R. M. (2014). A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2625–2628. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKU188>
- Hamidian, M., & Nigro, S. J. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Genomics*, 5(10), e000306. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000306/CITE/REFWORKS>
- Hammoudi, D., Ayoub Moubareck, C., & Karam Sarkis, D. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. In *Journal of Microbiological Methods* (Vol. 107, pp. 106–118). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.09.009>
- Hammoudi, D., Moubareck, C. A., & Karam Sarkis, D. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.09.009>
- Harrison, E., Guymer, D., Spiers, A. J., Paterson, S., & Brockhurst, M. A. (2015). Parallel Compensatory Evolution Stabilizes Plasmids across the Parasitism-Mutualism Continuum. *Current Biology*, 25(15), 2034–2039. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.024>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. In *Nature Microbiology* (Vol. 4, Issue 9, pp. 1432–1442). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>

- Higgins, P. G., Lehmann, M., & Seifert, H. (2010). Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 305. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.10.014>
- Higgins, P. G., Pérez-Llarena, F. J., Zander, E., Fernández, A., Bou, G., & Seifert, H. (2013). OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2121–2126. <https://doi.org/10.1128/AAC.02413-12>
- Higgins, P. G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., & Seifert, H. (2009). OXA-143, a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5035. <https://doi.org/10.1128/AAC.00856-09>
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3), 5. <https://doi.org/10.4161/VIRU.19700>
- Hujer, A. M., Higgins, P. G., Rudin, S. D., Buser, G. L., Marshall, S. H., Xanthopoulou, K., Seifert, H., Rojas, L. J., Domitrovic, T. N., Cassidy, P. M., Cunningham, M. C., Vega, R., Furuno, J. P., Pfeiffer, C. D., Beldavs, Z. G., Wright, M. S., Jacobs, M. R., Adams, M. D., & Bonomo, R. A. (2017). Nosocomial outbreak of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates containing blaOXA-237 carried on a plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00797-17/ASSET/1B8DF2D6-A7EE-4A67-A1B8-CD3C4AA336F8/ASSETS/GRAPHIC/ZAC011766620004.JPEG>
- Instituto de Salud Pública Chile. (2022). *Boletín de Resistencia Antimicrobiana*. Boletín de Resistencia Antimicrobiana.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jean, S. S., Lee, W. Sen, Lam, C., Hsu, C. W., Chen, R. J., & Hsueh, P. R. (2015). Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb.14.135*, 10(3), 407–425. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.135>
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C. R., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2015). Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 2015, Vol. 16, Pages 9654-9692, 16(5), 9654–9692. <https://doi.org/10.3390/IJMS16059654>

- Jiménez Pearson, M. A. G., Marcelo Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). Informe especial Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Pan American Journal of Public Health*. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1–8. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2019.65>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 101–109. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA390>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3. <https://doi.org/10.12688/WELLCOMEOPENRES.14826.1/DOI>
- Jurenaite, M., Markuckas, A., & Sužiedeliene, E. (2013). Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3165–3172. https://doi.org/10.1128/JB.00237-13/SUPPL_FILE/ZJB999092673SO1.PDF
- Kaitany, K. C. J., Klinger, N. V., June, C. M., Ramey, M. E., Bonomo, R. A., Powers, R. A., & Leonard, D. A. (2013). Structures of the class D carbapenemases OXA-23 and OXA-146: Mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4848–4855. <https://doi.org/10.1128/AAC.00762-13>
- Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., & Samuelsen, Ø. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resistance Updates*, 15(4), 237–247. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2012.06.001>
- Kenyon, J. J., & Hall, R. M. (2013). Variation in the Complex Carbohydrate Biosynthesis Loci of *Acinetobacter baumannii* Genomes. *PLoS ONE*, 8(4), 62160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062160>
- King, D. T., Sobhanifar, S., & Strynadka, N. C. J. (2017). The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In *Handbook of Antimicrobial Resistance* (pp. 177–201). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0694-9_10

- Klotz, P., Jacobmeyer, L., Stamm, I., Leidner, U., Pfeifer, Y., Semmler, T., Prenger-Berninghoff, E., & Ewers, C. (2018). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST294 harbouring the OXA-72 carbapenemase from a captive grey parrot. *J Antimicrob Chemother*, 73, 1098–1100. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx490>
- Knapp, S., Wieland, C. W., Florquin, S., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Tshimbalanga, N., Akira, S., & Van Der Poll, T. (2005). Differential Roles of CD14 and Toll-like Receptors 4 and 2 in Murine *Acinetobacter* Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-730OC>
- Krizova, L., Poirel, L., Nordmann, P., & Nemec, A. (2013). TEM-1 β -lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2786–2791. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKT275>
- Krueger, F. (2012). *Trim Galore: a wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries*. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
- Kumar, A., Felipe Opazo-Capurro, A., Castillo Ramírez, S., Nodari, C. S., Cayô, R., Streling, A. P., Lei, F., Wille, J., Almeida, M. S., Inacio De Paula, A., Carlos, A., Pignatari, C., Seifert, H., Higgins, P. G., & Gales, A. C. (2020). Genomic Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Belonging to Major Endemic Clones in South America. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584603>
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- L Murray, C. J., Shunji Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Give Chipeta, M., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., P Kumaran, E. A., McManigal, B., ... Resistance Collaborators, A. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

- Lam, M. M. C., & Hamidian, M. (2024). Examining the role of *Acinetobacter baumannii* plasmid types in disseminating antimicrobial resistance. *Npj Antimicrobials and Resistance* 2024 2:1, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00019-y>
- Lam, M. M. C., Koong, J., Holt, K. E., Hall, R. M., & Hamidian, M. (2023). Detection and Typing of Plasmids in *Acinetobacter baumannii* Using rep Genes Encoding Replication Initiation Proteins . *Microbiology Spectrum*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02478-22>
- Lean, S. S., & Yeo, C. C. (2017). Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: Good, bad, who knows? *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG), 279223. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01547/BIBTEX>
- Lederberg, J., & Tatum, E. L. (1946). Gene Recombination in Escherichia Coli. *Nature*, 158(4016), 558–558. <https://doi.org/10.1038/158558a0>
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Lee, Y., Bae, I. K., Kim, J., Jeong, S. H., & Lee, K. (2012). Dissemination of ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 in Korea. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1207–1211. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2012.05283.X>
- Lee, Y., Kim, C. K., Lee, H., Jeong, S. H., Yong, D., & Lee, K. (2011). A novel insertion sequence, ISAb10, inserted into ISAb1 adjacent to the blaOXA-23 gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 361–363. <https://doi.org/10.1128/AAC.01672-09/FORMAT/EPUB>
- Lee, Y.-T., Kuo, S.-C., Chiang, M.-C., Yang, S.-P., Chen, C.-P., Chen, T.-L., & Fung, C.-P. (2012). Emergence of Carbapenem-Resistant Non-baumannii Species of *Acinetobacter* Harboring a bla OXA-51-Like Gene That Is Intrinsic to A. baumannii. <https://doi.org/10.1128/AAC.00622-11>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/CJM-2018-0275/ASSET/IMAGES/CJM-2018-0275TAB1.GIF>

- Leungtongkam, U., Thummeepak, R., Tasanapak, K., & Sitthisak, S. (2018). Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE*, 13(12), e0208468. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0208468>
- Levy-Blitchtein, S., Roca, I., Plasencia-Rebata, S., Vicente-Taboada, W., Velásquez-Pomar, J., Muñoz, L., Moreno-Morales, J., Pons, M. J., Del Valle-Mendoza, J., & Vila, J. (2018). Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Peru. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41426-018-0127-9>
- Li, Y., Yang, X., & Zhao, W. (2017). Emerging Microtechnologies and Automated Systems for Rapid Bacterial Identification and Antibiotic Susceptibility Testing. *SLAS Technology*, 22(6), 585–608. <https://doi.org/10.1177/2472630317727519>
- Lin, J., Huang, S., & Zhang, Q. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and Infection*. www.elsevier.com/locate/micinf
- Liu, C. C., Kuo, H. Y., Tang, C. Y., Chang, K. C., & Liou, M. L. (2014). Prevalence and mapping of a plasmid encoding a type IV secretion system in *Acinetobacter baumannii*. *Genomics*, 104(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2014.07.011>
- Liu, H., Moran, R. A., Chen, Y., Doughty, E. L., Hua, X., Jiang, Y., Xu, Q., Zhang, L., Blair, J. M. A., McNally, A., Van Schaik, W., & Yu, Y. (2021). Transferable *Acinetobacter baumannii* plasmid pDETAB2 encodes OXA-58 and NDM-1 and represents a new class of antibiotic resistance plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(5), 1130–1134. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB005>
- Lopatkin, A. J., Meredith, H. R., Srimani, J. K., Pfeiffer, C., Durrett, R., & You, L. (2017). Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01532-1>
- Luísa C.S. Antunes, Paolo Visca, & Kevin J. Towner. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Makke, G., Bitar, I., Salloum, T., Panossian, B., Alousi, S., Arabaghian, H., Medvecky, M., Hrabak, J., Merheb-Ghoussoub, S., & Tokajian, S. (2020). Whole-Genome-Sequence-Based Characterization of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Hospital Outbreak. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00934-19>

- María M, C., Adriana S, L., Jorgelina, M.-B., Guillermo D, R., & Alejandro M, V. (2017). Three Novel *Acinetobacter baumannii* Plasmid Replicase-Homology Groups Inferred from the Analysis of a Multidrug-Resistant Clinical Strain Isolated in Argentina. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*, 3(4). <https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510046>
- Martinez, T., Martinez, I., Vazquez, G. J., Aquino, E. E., Robledo Correspondence, I. E., & Robledo, I. E. (2016). Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000289>
- Martins, N., Picão, R. C., Adams-Sapper, S., Riley, L. W., & Moreira, B. M. (2015). Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 698–701. <https://doi.org/10.1128/AAC.02415-14>
- Matos, A. P., Cayô, R., Almeida, L. G. P., Streling, A. P., Nodari, C. S., Martins, W. M. B. S., Narciso, A. C., Silva, R. M., Vasconcelos, A. T. R., & Gales, A. C. (2019). Genetic Characterization of Plasmid-Borne blaOXA-58 in Distinct *Acinetobacter* Species. *MSphere*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00376-19>
- Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 15–21. <https://doi.org/10.1177/2049936115621709>
- Mindlin, S., Beletsky, A., Rakitin, A., Mardanov, A., & Petrova, M. (2020). *Acinetobacter* Plasmids: Diversity and Development of Classification Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 11, 588410. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.588410/BIBTEX>
- Ministerio de Salud de Chile. (2020). *Informe elaborado por: Unidad de IAAS del Ministerio de Salud*.
- Moffatt, J. H., Harper, M., Adler, B., Nation, R. L., Li, J., & Boyce, J. D. (2011). Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), 3022–3024. <https://doi.org/10.1128/AAC.01732-10/>
- Mostachio, A. K., Levin, A. S., Rizek, C., Rossi, F., Zerbini, J., & Costa, S. F. (2012). High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(5), 396–401. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2012.01.021>

- 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*, 14(6). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02260-23>
- Munoz-Price, L. S., Arheart, K. L., Mills, J. P., Cleary, T., Depascale, D., Jimenez, A., Fajardo-Aquino, Y., Coro, G., Birnbach, D. J., & Lubarsky, D. A. (2012). Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *American Journal of Infection Control*, 40(9), e245–e248. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.03.032>
- Murray, C., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Collaborators, A. R. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2016). *Murray Medical Microbiology, 8th Edition*.
- Mussi, M. A., Grosso, F., Kumar, A., Brown, M. H., Singh, J. K., & Adams, F. G. (2019). Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03301>
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., & Viale, A. M. (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: Natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1432–1440. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005>
- Naas, T., Dortet, L., & I. Iorga, B. (2016). Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Current Drug Targets*, 17(9), 1006–1028. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160310144501>
- Naderi, G., Talebi, M., Gheybizadeh, R., Seifi, A., Ghourchian, S., Rahbar, M., Abdollahi, A., Naseri, A., Eslami, P., & Douraghi, M. (2023). Mobile genetic elements carrying aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to global clone 2. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1172861. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1172861/BIBTEX>
- Narra, H. P., & Ochman, H. (2006). Of What Use Is Sex to Bacteria? *Current Biology*, 16(17), R705–R710. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.024>

- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Brisse, S., Higgins, P. G., & Alexandr Nemec anemec, C. (2015). *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000043>
- Nigro, S. J., & Hall, R. M. (2016). Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(5), 1135–1147. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKV440>
- Noel, H. R., Petrey, J. R., & Palmer, L. D. (2022). Mobile genetic elements in *Acinetobacter* antibiotic-resistance acquisition and dissemination. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1518(1), 166–182. <https://doi.org/10.1111/NYAS.14918>
- Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., & Nicolas, M. H. (1993). Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), 939–946. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.939>
- Núñez Quezada, T., Rodríguez, C. H., Castro Cañarte, G., Nastro, M., Balderrama Yarhui, N., Dabos, L., Acosta Mosquera, Y., Plaza Moreira, N., & Famiglietti, A. (2017). Outbreak of blaOXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Chemotherapy*, 29(5), 321–324. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2016.1158936>
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1003>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance*.
- Opazo-Capurro, A., San Martín, I., Quezada-Aguiluz, M., Morales-León, F., Domínguez-Yévenes, M., Lima, C. A., Esposito, F., Cerdeira, L., Bello-Toledo, H., Lincopan, N., & González-Rocha, G. (2019). Evolutionary dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in Chilean hospitals. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 93–97. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.04.022>

- Organización Mundial de la Salud. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. La OMS Publica La Lista de Las Bacterias Para Las Que Se Necesitan Urgentemente Nuevos Antibióticos. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Pachón-Ibáñez, M. E., Fernández-Cuenca, F., Docobo-Pérez, F., Pachón, J., & Pascual, Á. (2006). Prevention of rifampicin resistance in *Acinetobacter baumannii* in an experimental pneumonia murine model, using rifampicin associated with imipenem or sulbactam. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(3), 689–692. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKL303>
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Papst, L., Beovi, B., Pulcini, C., Durante-Mangoni, E., & Rodríguez-Ba, J. (2018). Antibiotic treatment of infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: an international ESCMID cross-sectional survey among infectious diseases specialists practicing in large hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, 1070–1076. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.015>
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 21(3), 538–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- Pfeifer, E., & Rocha, E. P. C. (2024). Phage-plasmids promote recombination and emergence of phages and plasmids. *Nature Communications* 2024 15:1, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45757-3>
- Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., & Nordmann, P. (2005a). OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 202–208. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.202-208.2005>
- Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., & Nordmann, P. (2005b). OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), 202–208. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.202-208.2005>

- Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *European Society of Clinical Infectious Diseases*, 12, 826–836. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x>
- Porreca, A. M., Sullivan, K. V., & Gallagher, J. C. (2018). The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. In *Current Infectious Disease Reports* (Vol. 20, Issue 6). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0617-x>
- Potron, A., Poirel, L., Rondinaud, E., & Nordmann, P. (2013). Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Europe's Journal on Infectious Disease Surveillance, Epidemiology, Prevention and Control*. www.eurosurveillance.org
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). *Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon*. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Rafei, R., Osman, M., Dabboussi, F., & Hamze, M. (2019). Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. In *Future Microbiology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 1065–1080). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0134>
- Rashvand, P., Peymani, A., Mohammadi, M., Karami, A. A., Samimi, R., Hajian, S., Porasgari, D., & Habibollah-Pourzerehschi, N. (2021). Molecular survey of aminoglycoside-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from tertiary hospitals in Qazvin, Iran. *New Microbes and New Infections*, 42. <https://doi.org/10.1016/J.NMNI.2021.100883>
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E. P. C., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17278-2>
- Repizo, G. D. (2017). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* strains expressing the Type 6 secretion system in patients with bacteremia. *Virulence*, 8(7), 1099–1101. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1346768>

- OPS/OMS *Resistencia a los antimicrobianos* - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. (2023.). Retrieved April 12, 2023, from <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>
- Robertson, J., & Nash, J. H. E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics*, 4(8), e000206. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000206/CITE/REFWORKS>
- Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Ngoc, P. T., Van Boeckel, T. P., & Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 110, 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>
- Rodríguez, C. H., Balderrama Yarhui, N., Nastro, M., Nuñez Quezada, T., Castro Cañarte, G., Ventura, R. M., Cuba, T. U., Valenzuela, N., Roach, F., Mota, M. I., Burger, N., Aguayo, G. V., Ortellado-Canese, J., Bruni, G., Pandolfo, C., Bastyas, N., & Famiglietti, A. (2016). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Medical Microbiology*, 65(10), 1088–1091. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000328/CITE/REFWORKS>
- Rodríguez, C. H., Balderrama Yarhui, N., Nastro, M., Nuñez Quezada, T., Castro Cañarte, G., Ventura, R. M., Cuba, T., Ugarte Valenzuela, N., Roach, F., Mota, M. I., Burger, N., Aguayo, G. V., Ortellado-Canese, J., Bruni, G., Pandolfo, C., Bastyas, N., & Famiglietti, A. (n.d.). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in South America. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000328>
- Romano, N. C., & Fanti, L. (2022). Transposable Elements: Major Players in Shaping Genomic and Evolutionary Patterns. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells11061048>
- Rosado, C. J., Kondos, S., Bull, T. E., Kuiper, M. J., Law, R. H. P., Buckle, A. M., Voskoboinik, I., Bird, P. I., Trapani, J. A., Whisstock, J. C., & Dunstone, M. A. (2008). The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology*, 10(9), 1765–1774. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2008.01191.X>
- Salgado-Camargo, A. D., Castro-Jaimes, S., Gutierrez-Rios, R. M., Lozano, L. F., Altamirano-Pacheco, L., Silva-Sanchez, J., Pérez-Oseguera, Á., Volkow, P., Castillo-Ramírez, S., & Cevallos, M. A. (2020). Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 11, 527210. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01283/BIBTEX>

- Salje, J. (2010). Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(4), 296–317. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.494657>
- Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infection and Immunity*, 69(6), 3523–3535. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001>
- Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., & Haurat, M. F. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles: From Discovery to Applications. *Annual Review of Microbiology*, 75, 609. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-052821-031444>
- Scaife, W., Young, H., Paton, R., & Amyes, S. (1995). Transferable irapenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/DOI:10.1093/jac/36.3.585>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11), 000685. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685/CITE/REFWORKS>
- Šedo, O., Nemec, A., Křížová, L., Kačalová, M., & Zdráhal, Z. (2013). Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(8), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.08.001>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU153>
- Shelenkov, A., Akimkin, V., & Mikhaylova, Y. (2023). International Clones of High Risk of *Acinetobacter baumannii*—Definitions, History, Properties and Perspectives. *Microorganisms*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11082115/S1>
- Shen, Z., Tang, C. M., & Liu, G. Y. (2022). Towards a better understanding of antimicrobial resistance dissemination: what can be learnt from studying model conjugative plasmids? *Military Medical Research*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S40779-021-00362-Z/FIGURES/2>
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ014>

- Smani, Y., McConnell, M. J., & nimo Pachó, J. (2012). Role of Fibronectin in the Adhesion of *Acinetobacter baumannii* to Host Cells. *PLoS ONE*, 7(4), 33073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033073>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & Cruz, F. de la. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 434. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics* 2015 16:8, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Spellberg, B., & Bonomo, R. A. (2013). “Airborne Assault”: A New Dimension in *Acinetobacter baumannii* Transmission*. *Crit Care Med*, 41(8). <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31829136c3>
- Stalder, T., Cornwell, B., Lacroix, J., Kohler, B., Dixon, S., Yano, H., Kerr, B., Forney, L. J., & Top, E. M. (2020). Evolving Populations in Biofilms Contain More Persistent Plasmids. *Molecular Biology and Evolution*, 37(6), 1563–1576. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAA024>
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 27(7), 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR039>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tacconelli, E., Magrini, N., Carrara, E., Savoldi, A., Kattula, D., & Burkert, F. (2017). *WHO Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*. <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- Temkin, E., Fallach, N., Almagor, J., Primrose Gladstone, B., Tacconelli, E., & Carmeli, Y. (2018). Articles Estimating the number of infections caused by antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 2014: a modelling study. *The Lancet Global Health*, 6, e969–e979. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30278-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30278-X)

- Thomas, C. M. (2014). Plasmid Incompatibility. *Molecular Life Sciences*, 1–3. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6436-5_565-2
- Tilley, D., Law, R., Warren, S., Samis, J. A., & Kumar, A. (2014). CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12496>
- Tjernberg, I., & Ursing, J. (1989). Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS*, 97(7), 595–605. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1989.tb00449.x>
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006). IS CR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 296–316. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00048-05>
- Toleman, M. A., Spencer, J., Jones, L., & Walsha, T. R. (2012). bla NDM-1 is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2773–2776. <https://doi.org/10.1128/AAC.06297-11>
- Turton, J. F., Doumith, M., Hopkins, K. L., Perry, C., Meunier, D., & Correspondence, N. W. (2016). Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying a chromosomally integrated OXA-48 carbapenemase gene. *Journal of Medical Microbiology*, 538–546. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000248>
- 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*. *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 bla OXA-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., Vignon-Whaley, J. J. J., Vaamonde, J. A. A., Alonzo, L. A. P., Reséndiz, A. R., Álvarez, M. M., López, E. N. V., Franyuti-Kelly, G., Álvarez-Hernández, D. A., Guzmán, V. M., Bañuelos, J. E. J., Felix, J. M., Barrios, J. A. G., & Fortes, T. B. (2020). *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. *Antibiotics* 2020, Vol. 9, Page 205, 9(4), 205. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9040205>
- Venkateswaran, P., Vasudevan, S., David, H., Shaktivel, A., Shanmugam, K., Neelakantan, P., & Solomon, A. P. (2023). Revisiting ESKAPE Pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1159798. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1159798/BIBTEX>

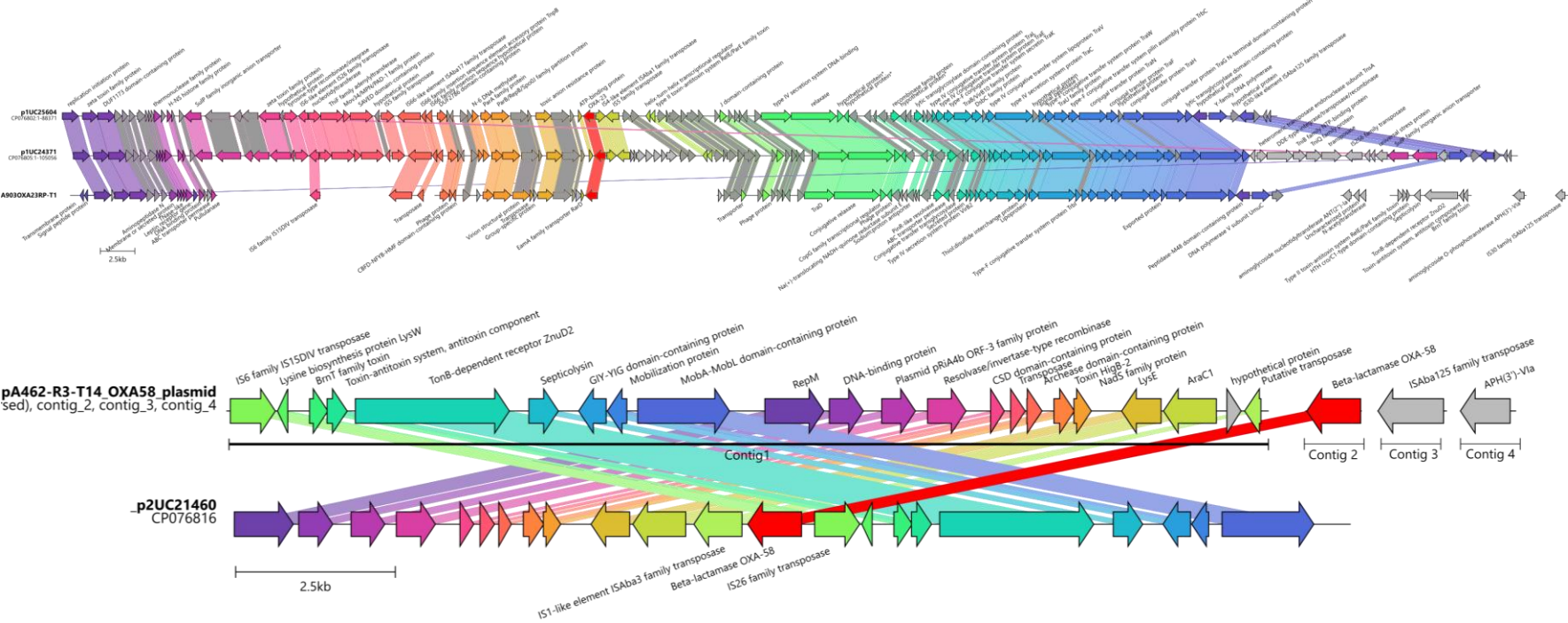
- Vijayakumar, S., Biswas, I., & Veeraraghavan, B. (2019). Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: An update. *Future Science OA*, 5(7), 395–2056. <https://doi.org/10.2144/FSOA-2018-0127>
- Vila, J., Marcos, M. A., & Jimenez De Anta, M. T. (1996). A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *Journal of Medical Microbiology*, 44(6), 482–489. <https://doi.org/10.1099/00222615-44-6-482/CITE/REFWORKS>
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes*, 11(11), 1–33. <https://doi.org/10.3390/GENES11111239>
- Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 174871. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00173/BIBTEX>
- Wailan, A. M., Sidjabat, H. E., Yam, W. K., Alikhan, N. F., Petty, N. K., Sartor, A. L., Williamson, D. A., Forde, B. M., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., Walsh, T. R., & Partridge, S. R. (2016). Mechanisms involved in acquisition of blaNDM genes by IncA/C2 and IncFIIY plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4082–4088. <https://doi.org/10.1128/AAC.00368-16>
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo-Lactamases: the Quiet before the Storm? *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 18(2), 306–325. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
- Wang, R., Van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., & Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-03205-Z>
- Wang, T., Costa, V., Jenkins, S. G., Hartman, B. J., & Westblade, L. F. (2019). *Acinetobacter radioresistens* infection with bacteremia and pneumonia. *IDCases*, e00495. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00495>
- WHO. (2021, November 17). *Antimicrobial resistance*. Antimicrobial Resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- WHO/OMS. (2017, February 27). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. La OMS Publica La Lista de Las Bacterias Para Las Que Se Necesitan Urgentemente Nuevos Antibióticos. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2016). *Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16>
- Woodford, N., Ellington, M. J., Coelho, J. M., Turton, J. F., Ward, M. E., Brown, S., Amyes, S. G. B., & Livermore, D. M. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(4), 351–353. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2006.01.004>
- World Health Organization. (2024). Bacterial Priority Pathogens List, 2024. In *Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*.
- Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-18>
- Yang, X., Dong, N., Chan, E. W. C., Zhang, R., & Chen, S. (2021). Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology*, 29(1), 65–83. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.012>
- Yang, Y., Wu, P., & Livermore, D. M. (1990). Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(5), 755–758. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.755>
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001/FORMAT/EPUB>
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>

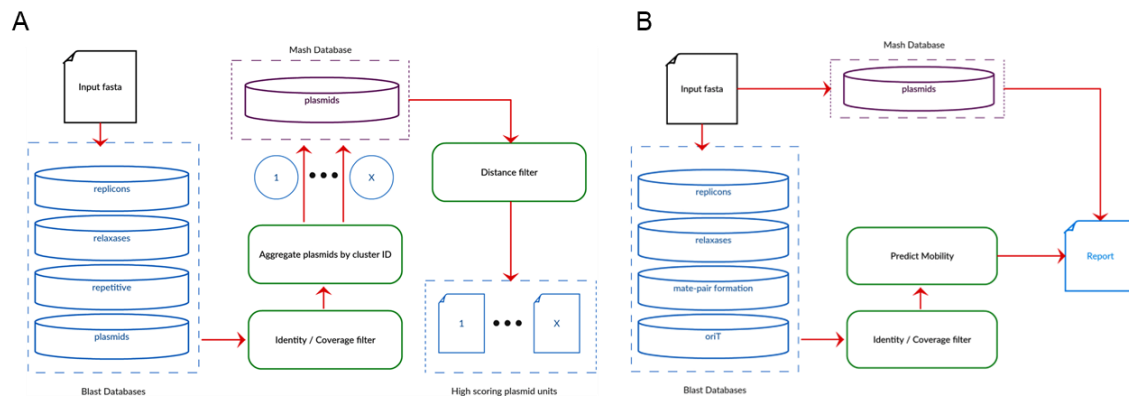
- Zeighami, H., Valadkhani, F., Shapouri, R., Samadi, E., & Haghi, F. (2019). Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4272-0>
- Zinder, N., & Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in Salmonella. *Journal of Bacteriology*, 64(5), 679–699. <https://doi.org/doi.org/10.1128/jb.64.5.679-699.1952>

Anexos

Anexo 1: comparación de plásmidos reconstruidos y plásmidos descritos en aislados chilenas.



Anexo 2: Flujograma de trabajo de herramientas MOB-suite.



A: esquema de trabajo de MOB-recon. B: Esquema de trabajo MOB-typer. Imagen extraída directamente de “MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies” (Robertson & Nash, 2018)

